



ISBN: 979-9299-16-0

Prosiding

Seminar Kimia Bersama ITB-UKM Keenam

**“Perkembangan Terkini Ilmu Kimia
yang Berlandaskan Kajian Sumber Alam”**

Denpasar, 17 - 18 Mei 2005
Bali - Indonesia



JSChem ITB-UKM VI-2005

Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Bandung

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains Teknologi dan Makanan
Universiti Kebangsaan Malaysia

Joint Seminar on Chemistry ITB-UKM

Diterbitkan oleh Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia

© Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut
Teknologi Bandung, 2005

Prosiding Kimia Bersama ITB-UKM Keenam

ISBN: 979-99-16-0

540

Penyuntingan semua tulisan dalam prosiding ini dilakukan tim editor Seminar Kimia
Bersama ITB-UKM Keenam 2005

Kata Pengantar Tim Editor

Assalamu'alaikum warohmatullahi wabarokatuhu,

Dengan Nama Allah Yang Maha Pengasih dan Penyayang, serta Maha Mengetahui

Kami, tim editor *Proceeding* Seminar Bersama ITB-UKM ke-6 tahun 2005 (*The 6th ITB-UKM Joint Seminar on Chemistry*), merasa berbahagia dan mengucapkan syukur kehadiran Allah, yang Maha Suci lagi Maha Tinggi, dengan dapat diterbitkannya buku prosiding ini. Buku ini, tentu saja, kami persembahkan kepada semua peserta seminar Bersama ITB-UKM ke-6, yang telah berpartisipasi pada pertemuan ilmiah di Hotel Sanur Plaza, Sanur, Denpasar, Bali, tanggal 17-18 Mei 2005, serta bagi kelangsungan kerjasama ITB-UKM di masa yang akan datang.

Penerbitan prosiding Seminar Bersama ITB-UKM kali ini dalam bentuk elektronik sebagai file *.pdf adalah yang pertamakali. Mudah-mudahan cara baru penerbitan ini dapat memuaskan semua pihak. Dalam prosiding kali ini, makalah kami urutkan berdasarkan abjad nama pertama pengarang yang muncul pada masing-masing makalah. Cara ini kami ambil bukan atas dasar pertimbangan kebiasaan akademik tertentu, melainkan semata-mata kemudahan dalam penyusunannya. Selain daftar isi, buku ini juga dilengkapi dengan index pengarang yang ditampilkan di bagian akhir setelah kumpulah makalah. Selain itu, para pembaca akan menjumpai hanya abstrak yang ditampilkan untuk beberapa makalah, karena kami tidak menerima makalah lengkap sampai batas akhir pemasukan yang kami tetapkan. Kami berharap hal ini tidak mengurangi makna dari kelengkapan buku prosiding ini, dan kami mohon maaf atas ketidaklengkapan tersebut.

Berkaitan dengan pertemuan Bersama ITB-UKM ke-6 dan penerbitan buku prosiding ini, izinkan kami untuk mengucapkan sekali lagi rasa terima kasih kami atas segala bantuan dari berbagai pihak, termasuk para sponsor kami, yang telah mendukung suksesnya kegiatan tersebut. Rasa terima kasih juga kami sampaikan untuk seluruh rekan-rekan panitia yang telah bekerja keras menyelesaikan tugas mulia ini.

Hormat kami

Tim Editor

Proceeding Seminar Bersama ITB-UKM ke-6 tahun 2005

Bandung, 12 Mei 2005

Daftar Isi

Kata Pengantar Editor	i
Daftar Isi	ii
Isolasi, Pemurnian Dan Karakterisasi Katalase Dari Buah Apel (<i>Malus Sylvestris</i> Mill. Kultivar Rome Beauty) sebagai Biomaterial Sensor A. A.Istri Ratnadewi , Zulfikar, Muhammad Naqib	1
Kemungkinan Penggunaan Sponge (<i>Porivera</i>) sebagai Bioindikator Pencemaran Logam dalam Lingkungan Laut A. Netty Siahaya	10
Paradigma Alternatif Dalam Analisa DNA Mitokondria Manusia A.S. Noer dan Yoni F Syukriani	11
Production And Quality Of Chitosan Extracted From Fungi Dawn Carmel Paul, Kalaivani Nadarajah, Abdul Jalil Abdul Kader	12
A Partnership Between Biodiversity, Natural Product Chemistry And Biopharmaceuticals A. Latiff , L. B. Din & I. M. Said	18
Preparation and Characterization of High Surface Area MgO and The Stability Study of Cypermethrin Abdul Rahim Yacob and Hanis bt Mohd Yusoff	27
Tingkah Laku Kakisan Aloi Al-Zn Dan Al-Zn-Mg Dengan Unsur Pengaktif Sn Di Dalam Air Laut Tropika Abdul Razak Daud , Mahdi Che Isa, Muhamad Daud, Mohd Yazid Ahmad	34
Preparation of Nickel Nanofilm onto Gold Thin Film by Electrodeposition Using Glucopone as Surfactant Abdul Razak Daud , Dahyunir Dahlan, Shahidan Radiman	42
Aktiviti Antioksidasi Beberapa Tumbuhan Tempatan Serta Kesannya Ke Atas Mutu Simpanan Burger Ayam Abdul Salam Babji , Norrakiah Abdullah Sani, Nur Huda Faujan dan Rohasmizah Hashim	46

Kajian Jangka Hayat Dan Penerimaan Produk Bakteri Jenis Pre-proven, Pra-bakar Serta Thaw And Serve Norraakiah Abdullah Sani, Abdul Salam Babji , Nurakmal Othman, Norazam Hassan, Norhayati, Abdullah dan Nor Anisah Abdullah	53
Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Tipe Baru yang Dikatalisis oleh Enzim Laccase A. Herry Cahyana , Siswati Setiasih, Rossi M.T, Noorlela	60
Characterisation of Lead/acid Battery Materials: The Development of Long Life Maintenance-free Lead/Acid Batteries. Achmad Rochliadi , Roland De Marco	64
Pengaruh Temperatur dan Inhibisi oleh Natrium Nitrit dan Natrium Asetat Terhadap Laju Korosi Spesimen Baja Karbon ASTM 106 Gr B dari Pipa Minyak Unocal Indonesia, Co. Achmad Rochliadi , Rifa Rachmah, Bambang Ari Wahjoedi	71
A new investigation of Chrom Azurol S immobilized in XAD-2 by flow analysis method for building copper (II) sensor Afnidar, Musa Ahmad , Lee Yook Heng, Rita Sundari	79
Studi Pola Pengkelatan Ligan Pirazolil Pada Kompleks Iridium Dikarbonil Dalam Larutan Agus Abhi Purwoko	80
Sintesis Dan Ujian Awal Aktiviti Anti-bakteria Dan Fungi Beberapa Terbitan Benzoiltiurea Ahamad Sahali Mardi dan Bohari M. Yamin	81
Exploration of Thermophilic Microorganism From Hot Springs Around Bandung Akhmaloka , H. Pramono, E. Susanti, M.R. Moeis, L. Ambasari, A.Suharto, I.N. Tika, H. Helwati, and F. Madayanti	86
Isolasi Senyawa Antrakuinon dari Cassia multijuga (Leguminosae) Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, Mulyadi Tanjung, Yusamsutin, Azizah, and Dahlia Safa Marwati	94
Bacterial Community Analysis of Gedongsongo Hot Spring: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis A.L.N. Aminin , M. Asy'ari1, N.S. Mulyani, F. Madayanti, P. Aditiawati, and Akhmaloka	100

Kesan Suhu Dan Tekanan Semasa Penggorengan Terhadap Ciri-ciri Pengelatinan Tepung Beras	Salma, M.Y, Maskat, M.Y, Wan Aida, W.M. & Aminah, A.	106
Pemisahan Cerium dari Mineral Monasit dengan Teknik SLM Bertingkat	Aminudin Sulaeman , Buchari dan Ummy Mardiana	110
Kajian Kehadiran Platinum, Palladium dan Rhodium Dalam Sampel Debu Jalan dan Rumput Menggunakan Teknik Spektrometri Jisim Gandingan Plasma Teraruh (ICP-MS)	Amran Ab.Majid , Hidayah Sahar , Afzana Anum Ahmad Anuar dan Muhamad Samudi Yasir	117
Ekstraksi Enzimatis Santan Suatu Upaya Menghasilkan Minyak Kelapa dengan Kandungan Medium Chain Triglycerides Tinggi.	Amril Latif	123
Glyphosate Biodegradation Pathway On Using E. Coli and Pseudomonas sp Bacteria	Anna Permanasari , Zackiyah, Hokcu S., Ida I., and Dadan S.	132
Pemekatan Emas(I) Sianida Dengan Metode Ekstraksi Kembali (Stripping)	Ani Mulyasuryani dan Novi Christina	137
The Plant Growth Regulator Spray on Fruits: Dilemma Persists?	Arba'at Hassan & Maimunah Sokro	141
Utilisation Of Bentonite As Adsorbent In Wastewater Treatment Of Alcohol Industry	Asep Supriatna , Hayat Sholihin, and Adi Pramono	150
Production and Acute Toxicity Studies Of Fungal (Cunninghamella elegans 2A1) Oil Rich In g-Linolenic Acid	Ayub Mohd Yatima , Mohd Khan Ayoba, Suriah Abd Rahmana, Osman Hassana, Wan Mokhtar Wan Yusoffb, Aidil Abd Hamidb, Mohd Sharizan Ahmad Shahrifuna, Syahida Maarofa	155
Pemodelan Maklumat Biodiversiti: Pendekatan Objek Digital Informatif	Ashraf Jaradat, Aziz Deraman , Sufian Idris, Laily Din & Nizam Said	158

Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Lipase Dari Kompos	
B. V. E. Viera , F. Madayanti dan Akhmaloka	164
Genetic Variation of Malaysian Banded Leaf Monkey Inferred from Mitochondrial DNA Cytochrome-b Sequences	
Badrul Munir Md-Zain , Vun Vui Fui ¹ , Zainal Zahari Zainuddin, Mahani Mansor Clyde	165
Heavy Metals Migration Beneath Unlined Waste Disposal Site At Dengkil, Selangor, Malaysia	
Abdul Rahim Samsudin, Bahaa-eldin Elwali A.Rahim , Wan Zuhairi Wan Yacob, and Abdul Ghani Rafek	170
Perilaku Peralihan Fasa Gegala (Pitch) Karbon Mesomorfik	
Bambang Ariwahjoedi	177
Development of dyeless pH optode based on poly-o-toluidin films	
B. Kuswandi , E. Agustina, A.A Gani and E. Asijati	178
Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Fasa Diam Kromatografi Lapis Tipis Pada Pemisahan Hasil Ekstraksi Tar Batubara Dengan Pelarut Piridin Dan n-Heksana	
Bambang Setiaji , Sri Sudiono, Sura Menda Ginting	185
Determination Of Aflatoxins B1, B2, G1 And G2 In Traditional Medicines Of South-East-Asian Countries	
Bahrudin Saad , Ikenna Alphonse Osi, Muhammad Idris Saleh, Norziah Mohd Hani, Ahamad Abu , Noor Hasani Hashim, Norhayati Ali	191
Tiosianat Dan Isotiosianat Dalam Sintesis Terbitan Tiourea Tindak Balas Lama Tetapi Produk Dan Mekanisma Baru	
Bohari M. Yamin	192
Chemical Constituents from the Roots of <i>Goniothalamus macrophyllus</i> (Annonaceae)	
Bong Pei Thing , Laily B. Din dan Nik Idris Nik Yusoff	196
Uji Toksisitas Hasil Degradasi Surfaktan Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS) Sebagai Bahan Deterjen Pembersih	
Budiawan , Yuni Fatisa	199

Pembuatan Membran Selulosa Asetat dari Pulp Abaka (<i>Musa textilis</i>)	
C.L. Radiman dan S. Wafiroh	209
Synthesis of New Chiral 2-Substituted 1,3-Benzoxazin-4-One and its Applications in Asymmetric Synthesis	
C. Ciptati and Patrick Perlmutter	216
Mechanical Performance of Natural Fiber Reinforced Polyester Composites from Glycolysed PET Waste	
D. R. Abu Bakar , I. Ahmad ¹ , A. Ramli	217
The Synthesis of Some Histidine Derivative Compounds Containing Imidazole Ring Framework and the Investigation of Their Inhibitor Activity towards Carbon Steel in 1% NaCl Solution	
Deana Wahyuningrum , Reza Brahma, Sadjah Achmad, and Bambang Ariwahjoedi	223
Optimasi pH dan Suhu pada Isolasi Minyak Atsiri dari Daun Nilam <i>Pogostemon cablin</i> Benth dengan Fermentasi oleh <i>Pseudomonas mendocina</i>	
Deasyana Mihardja , F. Madayanti	231
Expression of ALP1 in <i>Escherichia coli</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Dessy Natalia , Gunawan Harinanto, Wangsa T. Ismaya, Toto Subroto, Zeily Nurachman, Soetijoso Soemitro, Thijs Karper, Slavko Krajl, Bauke Dijkstra, Lubert Dijkhuizen	237
Sintesis Kompleks Besi(II)-3,6-di-2-piridil-1,2,4,5-tetrazin (DPTz)	
Djulia Onggo , Dini Zakiah Fathiana, Ibrahim Baba.	241
Modifikasi Pati Tapioka Dengan Asam Akrilat Dan Akrilamida Sebagai Flokulan	
Endang Asijati W , Winda Puspitasari, Yanti Sabarinah S	245
Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Pembentukan 5-Hidroksimetil Furfural dalam Larutan Sirup Fruktosa	
Endang Saepudin , Muhamat Syahroni	253
Biological activities of thiophene-hydrazone and the zinc (II) complexes tested on human normal and cancer cell lines	
Endom Ismail , Hapipah Mohd Ali, and Bohari M. Yamin	259

Preparation and Structural Features of Tetraethylene Glycol (EO4) and Pentaethylene Glycol (EO5) with Neodymium(III) in the presence of Picrate Anion Muhammad I. Saleh, Eny Kusrini , Rohana Adnan, Bahruddin Saad, Abdussalam Salhin, Bohari M. Yamin	263
Keanekaragaman Molekul dari Tumbuhan Moraceae dan Potensinya sebagai Anti Tumor Serta Pengembangan melalui Kultur Jaringan Euis Holisotan Hakim , Yana Maolana Syah, Lia Dewi Juliawaty, Sjamsul Arifin Achmad, Lukman Makmur dan Tri Muji Ermayanti	269
Senyawa Antifertilitas Diterpenoid Alkaloid dari Daun Senggugu (<i>Clerodendron serratum</i> L.Moon) terhadap Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>) Jantan Secara in vitro Euis Julaeha , Supriyatna, Unang Supratman, dan Anas Subarnas	280
Isolasi Dan Uji Kemampuan Lipolitik Bakteri Isolat Bak Biologis Pabrik Penyamakan Kulit Evi Susanti , Fariati, Utami Sri Hastuti	283
Build Layered Structure Of Polyalkylthiophene (Pat-6)/Polyquinoline (PQ) films By Spin Coating-Method F.A. Asmuruf , R. SATO, N. ASANO, N. TAN , K. ORIHARA 2	289
Synthesis Of Tetrapropylammonium Tetrathiotungstate As Photocatalyst Precursor For Water Splitting Fadhli Hadana Rahman , Mohammad Kassim, Rusli Daik, Khuzaimah and Wan Ramli Wan Daud	293
Kompleks Ion Logam Besi Dengan Ligan Di-2-piridil keton Fahimah Martak , Djulia Onggo, Mimin A., Bohari M. Yamin, Seik Weng Ng	298
Glomerella cingulata cutinase: In silico protein modeling Farah Diba Abu Bakar , Fauziah Hanim Shaarani1, Sheila Nathan, Nor Muhammad Mahadi and Abd. Munir Abd. Murad	302
Pemanfaatan Limbah Padat Pabrik Penyamakan Kulit Sebagai Pupuk Lengkap Organik yang Potensial Fariati , Yudhi Utomo, Evi Susanti, Nugrahaningsih	306
Perubahan Citarasa Dan Nilai Nutrisi Keju Tahu Dengan Penambahan Beberapa Intermediet Metabolit Dan Kapang F. Madayanti , Lengga Priani, Nurul Qomariah, Hesti Lina, Akhmaloka	309
Optimasi produksi enzim glukosa oksidase dari <i>Aspergillus niger</i> L 51 indigenus Firman AP	314
Assesment of River Water Quality Status By Using a New Developed Water Quiality Index System M. A. Fulazzaky and B. Machbub	320

Pengaruh Dosis Iradiasi Pada Khitosan Sebagai Bahan Penginduksi Pertumbuhan Tanaman Cabe (CacinumAnnum)	
Gatot Trimulyadi R , Kadariah, Anik Sunarni, Isni Marlianti dan Dian Iramani	328
Prediction of Solvent Vapor Solubility in Polymer Solutions Using Group Contribution Models	
Gede Wibawa	333
Taburan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang dan hasil luluhawanya di kawasan Sungai Merbok, Kedah	
Habibah HJ Jamil , Wan Fuad Wan Hassan & Mohamad MD Tan	338
Isolasi Senyawa Flavon Dari Tumbuhan <i>Cryptocarya Costata</i> (Lauraceae)	
Hanapi Usman , Euis H.Hakim, Sjamsul A.Achmad, Tjodi Harlim, M.Noor Jalaluddin, Yana M. Syah, Lia D.Juliawati, Lukman Makmur. Mariko Katajima	345
X-ray crystallography and biological properties nitrobenzoylhydrazone with Zinc, Nickel, Cadmium and Copper Complexes.	
Hapipah Mohd Ali, Siti Nadiyah Abdul Halim, Nurul Fadhillah K. Aripin, Wan Jefri Basirun, Sharifudin M. Zain, Endom Ismail, Nordin Hj Lajis, Bohari M. Yamin and Seik Weng Ng	350
DAVIDIOL A, SUATU TRIMER resveratrol dari TUMBUHAN <i>Shorea RUGOSA</i>	
Haryoto Saroyobudiyono , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Lia D. Juliawaty, Ikram M Said, Laily B. Din, Jalifah Latip	357
Chemical and Biological Studies of Some Malaysian and Sumateran Curcuma	
Hasnah M. Sirat , Shajarahtunnur Jamil, Lee Lay Meng and Ngai Mun Hong	361
Penambahan Pati Pada Hasil Oksidasi LLDPE dengan Menggunakan Pipet Eppendorf	
Hasnah Muin	368
Elektrode Kawat Terlapis Perak/Perak Iodat Sebagai Elektrode Selektif Ion Iodat	
Hendyk Krisna Dani , Ani Mulyasuryani, Wiwit Nurhayati, Sri Hidayati	373
Pengembangan Metode Baru Untuk Penentuan Tiosianat Secara Kontinyu	
Hermin Sulistyarti , E. Sulistyoyo, A. Wiryawan, D. I. Lestari, D. Umaningrum	374
Biodiversitas Mikroorganisme Termofilik Isolat Kawah Hujan, Kamojang, Jawa Barat	
H. Yohandini , F. Madayanti, P. Aditiawati, dan Akhmaloka	375
Pengaturan Sifat Hidrofilik dan Hidrofobik Membran Silika MCM-41 dan MCM-48	
Hens Saputra , Anwar Mustafa dan Mochamad Rosjidi	380
Isolation and Identification of Non Polar Compounds from Stem Bark of <i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn	
Hery Suwito , Mulyadi Tanjung, Alfinda Novi Kristanti, Mamik M Q	387
Sebatian Ditiokarbamat: Kepelembagaan Sintesis dan Kajian Aplikasi	
Ibrahim Baba, Yang Farina Abdul Aziz dan Abdul Hamid Othman	393
Elektroda Pasta Karbon yang Dimodifikasi dengan Xilenol Oranye untuk Analisis Timbal	
Indra Noviantri, Francisca N. Liman	401

Analisis Struktur Hasil Kopolimerisasi dari Monomer b-Butirolakton dan d-Valerolakton dengan Katalisis Aluminoksan I. M. Arcana , B. Tanajaya, B. Anwar, C.L. Radiman, dan M.A. Sulfikar	402
Sintesis Forbazol Baru dan Turunannya I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja	409
Asalan Batuan Serpentin Di Sepanjang Sempadan Jalur Tengah Dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia Ibrahim Abdullah & Jatmika Setiawan	415
Pengadunan Getah Asli dengan Termoplastik: masalah dan penyelesaian Ibrahim Abdullah	419
Bencana Tsunami 26.12.2004: Maklumat Sains untuk Pendidikan dan Kesedaran Masyarakat Ibrahim Komo , Mazlan Othman	424
Effect of food plants on the development, reproduction and feeding behavior of <i>Spodoptera exigua</i> L. and <i>Plutella xylostella</i> L. Idris, A.B. , Selvi, C., Emelia. O. and Leong, C.K.	431
Sintesis dan Karakteristik Senyaa Spin Crossover $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ Iis Siti Jahro , Djulia Onggo, Susanto Imam Rahayu, Ismunandar dan Ibrahim Baba	439
Immunosuppressive and Antiinflammatory Compounds From Malaysian Medical Plants Ikram M. Said , Laily B. Din, A. Latiff and Shigeo Tanaka	444
Kudraflavon C dan Artokarpin, Dua Senyawa Flavonoid Terisoprenilasi dengan Aktivitas Sitotoksik dari <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lamk Iqbal Musthapa , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Lukman Makmur, Zalifah Latif, Laily B. Din, Ikram M. Said	449
Kesan Rawatan Permukaan Gentian Aramid Terhadap Sifat Mekanik Komposit Getah Asli yang Diperkuat Gentian Aramid Ishak Ahmad , Chen Kee Cheong	453
A Comparison of Two SPE Cartridges Use for the Extraction of Fluroxypyr from Soil Ismail B. S , Tan Y. A. and Halimah Muhammad	459
Synthesis of $KSbO_3$ -type Structure Metal Oxides Ismunandar , Hefill Hardiman, and M Hasan Abadi	463
Chemical Differences and Similarities of Malaysian <i>Acronychia pedunculata</i> Jalifah L , A. Latiff. M., Noor Hapeedah M.A, Hairul, M, Darmiwati, R.1, Hasrina, H.1, Norhafipah, M.1, Yana M. Syah ³ , Euis H. Hakim ³	467
Biopolimer Berliang Sebagai Penjerap Logam Berharga Jamaluddin Mohd. Daud dan Wan Nor Azami Wan Omar	471
Electric Field Enhancement Effect dalam TiO_2 Fotoelektrokatalisis: Prinsip Kerja, Konsekuensi Desain Reaktor, dan Usulan Novel Photoelectrocatalytic Reactor Jarnuzi Gunlazard , Hedi Surahman, Slamet	477

Fabrikasi Elektroda Karbon Pasta Yang Dimodifikasi (EKPM) dengan Kaliks(6)aren: Perilaku Siklik Voltametri dan Aplikasinya Untuk Penentuan Ion Hg ⁺⁺ Jarnuzi Gunlazuardi , Rahmat Wibowo, Zaenal Awaludin ; Ros Kusuma Dewi , dan Cuk Imawan	478
Sifat dan Ciri Tanah Bris di Setiu, Terengganu Nurulhuda Edy Muslim, Jumaat Hj. Adam , Muhamad Barzani Gasim, Sahibin Abd. Rahim, Jumat Salimon, Geri Gopir, Ramlan Omar dan Marlia Mohd Hanafiah	487
Kajian pencirian sifat fiziko-kimia minyak biji kekabu, Ceiba petandra Khairul Asmak Abd. Kadir dan Jumat Salimon	492
Antibacterial Properties Of Chitosan Extracted From Absidia sp. DR D.C. Paul, K. Nadarajah & J. Kader	496
Perbandingan Produk Bakeri Dibakar Terus Dengan Produk Bakeri Sejukbeku Serta Dibakar Abdul Salam Babji, Norrakiah Abdullah Sani dan Khairul Faizal Pa'ee	504
Dua Senyawa Oligomer Reaveratrol Dari Kulit Batang Shorea Parvifolia Dyer. (DIPTEROCARPACEAE) Kholifatu Rosyidah , Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Euis H. Hakim, Lukman Makmur, Lia D. Juliawati, Laily B. Din, Jalifah Latip, Ikram M. Said	508
Studi Struktur Fungsi Domain Polimerase DNA Pol I ITB L. Ambarsari , F.Madayanti, M.R. Moeis dan Akhmaloka	514
Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitor Active Constituents From The Twigs of Taxus sumatrana L. B. S. Kardono , Lince Yarni, Chairul, and S. Suryowidagdo	521
Kajian Kimia Liken dan Kajian Kimia Tumbuhan Berbunga Laily B. Din , Mohd Wahid Samsudin, Zuriati Zakaria, Ikram M. Said & A. Latiff	522
Acrylic Nanosensors for the Interrogation of Chemical Content in Microorganisms Lee Yook Heng , Elizabeth A. H. Hall, Alan Tunnacliffe, Musa Ahmad	527
Senyawa-senyawa sitotoksik dari tumbuhan Artocarpus (Moraceae) Lia Dewi Juliawaty , Euis Holisotan Hakim, Yana Maolana Syah, Sjamsul Arifin Achmad dan Lukman Makmur	534
Structural Transformation in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)}\text{3NbO}_3$ ($x = 0, 0.1, 0.25$) Perovskites Lindarti Purwaningsih , and Ismunandar	540
Total flows contribution of the Tasik Chini feeder rivers and its significant water level, Pahang, Malaysia Muhammad Barzani Gasim , Mohd. Shuhaimi Othman and Tan Choon Chek	543
Penyediaan Tipisan Nipis Elektrokromik Titanium Dioksida (TiO ₂) Menggunakan Kaedah Sol Gel Mansor Abdul Hamid , Ismail Ab. Rahman	548

Profil Konsentrasi Oxygen Axial Dalam Air Pada Kolom Gelembung Bersekat Vertikal Secara Eksperimen dan Simulasi Margono , Hary, Dicky, Basuky S, Revan A	549
NMR Studies on the Binding of Methylene Blue – Oligonucleotide Conjugates to Double-Stranded DNA Maria Goretti Marianti Purwanto , K. Weisz	550
Peat Adsorbents Prepared with Natural Rubber Latex As Filter Media For The Treatment of Domestic Wastewater M.A. Naw i, S.S.Chow and M.Z. Ibrahim	551
Preparation and characterization of porous PMMA-SiO ₂ hybrid membrane Muhammad Ali Zulfikar and Abdul Wahab Mohammad	558
Kualiti Air di Tasik Chini, Pahang, Malaysia M. Shuhaimi-Othman , Mohd Barzani, Lim Eng Chong dan Mushrifah Idris	564
Korelasi Umum Konstanta Henry untuk Sistem Solute Polar dalam Polimer M. Arif Batutah , Gede Wibawa dan Kuswandi	567
Sintesis Kopolimer Poli(e-kaprolakton-co-2,2-dimetil-1,3-propandiol): Poliester Polioli Alternatif untuk Pembuatan Poli(Ester-Uretan) Yang bersifat Mudah Terbiodegradasi M. Hasan , S.I. Rahayu, C.L. Radiman, I. M. Arcana	574
Application of QSAR Models in Database Mining: Predicting Anti Tuberculosis Activity of Plant Terpenoids. Mohamed Noor Hasan and Neni Frimayanti	580
Esterifikasi Asam Monooleat dan Sorbitol dengan katalis Asam Sulfat Mahfud , Nanik Nurcahyani, Naili Sofianingsih dan Lik Anah	583
Perbandingan Tahap Penumpukan Logam-Logam Berat dalam Ikan Tilapia dari Tasik-Tasik Yang Tercemar dan Tidak Tercemar Maimon Abdullah , Shahani Shahar, Chung Pei Yin, Norela Sulaiman Aminah Abdullah dan Salmijah Surif	589
Extraction and Purification of Arachidic Acid from Rambutan (Nephelium lappaceum) Kernel Fat Mamot Said , Jalifah Latip & Suhana Samat	597
Pengaruh Perlakuan dan Komposisi Terhadap Karakteristik Membran Poliuretan dari Asam Lemak Bebas Terhidrasi dan 2,4 Toluena Diisosiyanat Marlina , N.M. Surdia, C.L. Radiman, S. Achmad	604
Distribution of Fatty Acids in the Mawddach Estuary, United Kingdom Masni Mohd Ali	609
Characterization of microemulsion-derived conductivity polyaniline-coated Cadmium Sulphide nanocomposites Khiew Poh Sima, Huang Nay Minga, Shahidan Radimana, Md Soot Ahmad	617
Aksiom-Aksiom Awal Kristalografi Mohammad Alinor bin Abdul Kadir	618

Application of chemometrics in Environmental Chemistry for Sustainable Utilisation of Water Resources: Langat Basin as a Case Study Mazlin B. Mokhtar , Hafizan Juahir, Sharifuddin M. Zain, Ijan Khushaida M. Jan, M. Ekhwan Toriman, Baharuddin Abdullah, Zaihan Jalaludin	619
Polynuclear Molybdenum Complexes: Synthesis, Electrochemical And Spectroelectrochemical Studies Mohammad B. Kassim , Jon A. McCleverty and Michael D. Ward	628
Studi Kimia Kuantum Tahap Awal Pirolisis TNTA menggunakan (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida Sebagai Model Muhamad A. Martoprawiro dan Nurul Irian Putra	636
Equation of State of Fluid System : A Theoretical Approach M. Utoro Yahya	637
Assessment of Natural Radioactivity In Water and Sediment From Tin Tailing Area In Malaysia Mohsen Nasirian & Ismail Bahari	640
Exploring differences in The Similarity of Lanthanide Polyether Complexes Muhammad I. Saleh , Eny Kusriani, Rohana Adnan, Ismail A Rahman, Bahruddin Saad and Bohari M. Yamin	641
Kandungan Sebatian Fitokimia Dalam Daun dan Kaliks Tanaman Roselle (Hibiscus sabdariffa L) Pada Berlainan Kadar NPK Herman, S., Mohamad O , Bakhendri. S., Ujang. S dan Muntaz. A.B	642
Sifat-sifat Pentabletan Akarmanis (Radix Glycyrrhizae) Widianingsih dan Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin	646
Kandungan Radionuklid Tabii Dalam Sampel Amang, Tanah dan Air di Sekitar Kawasan Industri Perlombongan di Dengkil Selangor Muhamad Samudi Yasir , Amran Ab.Majid & Redzuwan Yahaya	653
Development of Organic Light Emitting Diode in Malaysia: a NextGeneration of Flat Panel Display Technology Muhammad Yahya , Muhamad Mat Salleh and Mursyidah	659
Voltammetri Striping Ion Raksa(II) Menggunakan Elektroda Polipirol/1,10-Dibenzil-1,10-Diaza-18-Crown-6 Muji Harsini , Buchari, Indra Noviandri, Susanto Imam Rahayu	666
Vatikanol A dan a-Viniferin, Trimer resveratrol dari ekstrak aseton kulit batang DIPTEROCARPUS RETUSUS Blume Muhtadi , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. Juliawaty, Lukman Makmur, Sjamsul A. Achmad, Ikram M. Said, Laily B Din dan Jalifah Latip	672
Flavonoid Compounds From SACCOPETALUM HORSFIELDII BENN (ANNONACEAE) Mulyadi Tanjung , Hery Suwito, Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, Mahmiah, Nanik Fauziah dan Unang Supratman	678

Kandungan Kimia Daripada <i>Garcinia mangostana</i> Muntaz Abu Bakar , Muhammad Sum Hj Idris	683
Penyediaan Membran Biomolekul Untuk Pembinaan Biosensor Bagi Pengesanan Ketoksikan Logam Berat Musa Ahmad , Francis Wong dan Lee Yook Heng	687
Vitamin E and Down Syndrome Musalmah, M , Sue Mian, T., Isnida, I., Gapor, M.T. and Wan Ngah, W.Z.	691
Biodiversitas Mikroorganisme Termofilik Kawah Manuk M. P. Widhiastuty dan Akhmaloka	692
Keragaman Senyawa-senyawa Oligostilbenoid dari Spesies <i>Shorea seminis</i> (Dipterocarpaceae) Nanik Siti Aminaha , Sjamsul Arifin Achmadb , Masatake Niwac, Yana M Syahb, Mariko Kitajimad, Euis Holisotan Hakim	696
Ekstraksi Cu ²⁺ Dalam Larutan NaCl Menggunakan Teknik Membran Cair Emulsi Sistem Aliran Semikontinu Nikmans Hattu	702
Pengaruh pengerjaan kitosan dan asam sitrat pada kain kapas terhadap sifat fisik kain Noerati	703
Crystallography in Japan Nobuo Tanaka	710
Tindakbalas Sinamoil Isotiosianat Dengan Analin Dan Morfolietilamina Noor Azilah M Kasim , Ibrahim N.Hasan dan Bohari M Yamin	711
Kajian Pemendapan Zarah Di Sekitar Kawasan Perindustrian Kecil Balakong, Selangor, Malaysia Norela Sulaiman , Mohd Rozali Othman, Maimon Abdullah, Salmijah Surif dan Wong Pick Foon	712
Kesan Penambahan Karbon Hitam ke Atas Sifat Mekanik dan Morfologi Adunan Getah Asli / Polistirena Norlinda Daud , Ibrahim Abdullah	713
Terbitan Ferosena Sebagai Mediator Dalam Sistem Biosensor Noorshida Mohd Ali , Bohari M. Yamin dan Lee Yoke Heng	714
O-metiloktandrenolona dari <i>Acronychia pedunculata</i> Noor Hapeedah , M. A, Jalifah L, Yana M. Syah, Euis H. Hakim	720
Chemical constituents from the roots of <i>Alseodaphne perakensis</i> Norizan Ahmat , Abdul Hamid, Jalifah Latip, Ikram M. Said and Laily B. Din	724
Sintesis, Pencirian dan Aktiviti Biologi Sebatian Trifenilstanum(IV) Ditiokarbamat Normah Awang , Ibrahim Baba, Yang Farina Abd. Aziz dan Bohari M. Yamin	728

Senyawa Flavon Terisoprenilasi dan Steroid Dari Kayu Akar Cempedak Jantan (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) Nurlelasari , Euis H. Hakim, Yana. M. Syah, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Lukman Makmur	735
Struktur Produk Tindak Balas Bis[Asetatotrifenilfosfinargentum(I)] Dengan BenzoilTiourea Terbitan Asid Amino Nurziana Ngah , Bohari M. Yamin dan Mohammad B. Kassim	739
Metil Linderon, Senyawa Calkon Termodifikasi dari Kayu Batang <i>Lindera polyantha</i> (Lauraceae) Nyoman S. Suastrri , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Lukman Makmur, Zalifah Latif, Laily bin Din, Ikram M. Said	744
Kajian Geokimia Organik Biomarka Hidrokarbon Pada Minyak Mentah Dan Sedimen Formasi Wonocolo R. Y. Perry Burhan	748
Corrosion Inhibition Of Carbon Steel In Sodium Chloride Solution By Benzotriazole- Effects Of Immersion Time And Temperature P. Yatiman , N. M. Surdia, S. Purwadaria, B. Ariwahjoedi and R. Suratman	756
Studi Struktur Fungsi Karboksi Terminal eRF1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> P.E. Susilowati , Subandi, F. Madayanti, P. Aditiawati dan Akhmaloka	761
The identification of compounds from liverwort <i>Plagiochila sandei</i> Dozy Pudjiastuti , P, Suwito, H, Nurul, A. Nugroho, DA, Kosela, S, Suwarso, W.P, Dai, Krohn, K.	766
Synthesis, characterization and biological activities of substituted salicylaldehyde-hydrazone and their metal complexes Hapipah Mohd Ali, Puvaneswary Subramaniam, Endom Ismail, Nordin Hj. Lajis, Sharifudin M. Zain, Wan Jefri Basirun and Ng Seik Weng	769
Fabrikasi Sensor Elektrokimia Glukosa Termediasi Berbahan Dasar Karbon Pasta : Parameter Penting untuk Aplikasi Biosensor Rahmat Wibowo , R. Flora Mariana dan Siswati Setiasih	773
Senyawa Stilbenoid dan Flavonoid dari <i>Artocarpus integer</i> (Thunb.) Merr. Rani Maharani , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lukman Makmur, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Ikram M. Said, Laily B. Din, Jalifah Latip	779
A Study on Incineration on Oil Sludge Contaminated with Naturally Occurring Material Redzuwan Yahaya , Amran Ab.Majid & Muhamad Samudi Yasir	787
I Sorpsi Air Pengeringan Ikan Kayu Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>) Rita Hayati , Aminah Abdullah, Mohd.Khan Ayob, Soewarno T. Soekarto	790

Application of Cluster Variables and Factor Analysis in Al (III) sensor using PAN sol gel film entrapment Rita Sundari , Musa Ahmad, Lee Yook Heng	796
Electrooxidation Of Ethanol To Acetic Acid On Platinum Wire Electrodes Riyanto , Mohamed Rozali Othman, Jumat Salimon	801
Carbonitriding Of AISI 316 By Microwave Plasma Enhanced Chemical VAPOUR Deposition Process R.J. Talib , A.H. Hashim, J.J. Mohamed, M.S. Shaari, M.A. Hamid	807
Sintesis Kompleks Nikel(II)-N,N,-Dimethyl-ethylendiamin (dmed) Rosdiana , Djulia Onggo, Ismunandar, Bohari M. Yamin	813
Dua Senyawa Oligostilbenoid Dari Kulit Batang Shorea Mecistopteryx Rild (Dipterocarpaceae) Rusdiyah Fatatika , Yana M. Syaha, Sjamsul A. Achmada, Euis H. Hakima, Lukman Makmura, Lia D. Juliawatia, Laily B. Dinb, Jalifah Latipb, Ikram M. Saidb	818
Genetic Engineering of Oil Palm for the Production of Biodegradable Plastics Ruslan Abdullah , Rashdan MM, Siti Azma J, Joseph JL & Yeun LH	823
Studi Komputasi Ab Initio Tahap Awal Mekanisme Reaksi Oksidasi Metil-tercier-butileter (MTBE) yang Diawali Oleh Radikal OH Rustaman dan Muhamad A. Martoprawiro	830
Pengembangan Sensor Amonium Dengan Teknik Fotopolimer dan Elektrod Bercetak Skrin Sagir Alva , Lee Yook Heng, Musa Ahmad	836
Resveratrol Dimers From Hopea Dryobalanoides: Cytotoxic Effects And Chemotaxonomic Significance Sahidin , Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Laily B. Din, Jalifah Latip	841
Pembuatan Glukose Dari Bagas Secara Enzimatik Dengan Perlakuan Pendahuluan Saraswati	847
Karakterisasi Sifat-Sifat Fisikokimia Montmorilonit Sebelum Dan Setelah Diinterkalasi Besi Oksida Serly Jolanda Sekewael	848
Konstruksi dan Ekspresi Mutan Delesi DNA Pol I ITB S. Nurbaiti , S. Ekawardhani, L.R. Sihasale dan Akhmaloka	849
The Effect Of Garcinia Atroviridis Extracts On Lipid Composition Of Normal Satirah Zainalabidin , Jalifah Latip, Engku Norbaya Muda and Paden Morat	854
Pemanfaatan Biji Kelor (Moringa Oleifera) Sebagai Koagulan Pada Proses Koagulasi/Flokulasi Dan Sedimentasi Limbah Cair Industri Pencucian Jeans Setiaty Pandia dan Khairul Amdani	859

Karakterisasi Enzim α -Amilase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofil SW2 Siswati Setiasih , Budiasih Wahyuntari, Trismilah, dan Dewi Apriliani	864
Kandungan Senyawa Kimia dari Tanaman <i>Garcinia Spp</i> Yang Tumbuh di Indonesia Soleh Kosela	871
Quantitative Analysis of Trace pp-DDE in Cod Liver Oil by Isotope Dilution Mass Spectrometry during APMP.QM-P4 Pilot Study and Uncertainty Evaluations Sri Sumartini , Nuryatini, Sumardi	872
Senyawa Oligomer Resveratrol Dari Kulit Batang <i>Shorea Platyclados</i> (Dipterocarpaceae) Siti Aisyah , Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Euis H.Hakim, Lukman Makmur, Lia D. Juliawaty, Laily B. Din, Jalifah Latif, Ikram M. Said.	878
Termodinamika pada Berbagai Ranah Keadaan dan Rekonstruksi Molekularnya Susanto Imam Rahayu	882
Isolasi, Purifikasi Dan Karakterisasi Lipoksigenase Dari Kacang Panjang (<i>Vigna sesquipedalis</i>) Sumi Hudiyo , Faika Dwiyaniti dan Susilowati HS	883
Studi Pendahuluan Analisis Kandungan Senyawa Ganoderma Polisakarida/GPS Sebagai Prebiotik Pada Jamur <i>Lingzhi</i> (<i>Ganoderma lucidum</i>) Susilowati Hadisusilo , Erlin Nurtiyani, Yepy Hardi R.	889
Sintesis 1,3-Dihidroksi-2-(4-Piridil)-4,5-Dimetil Imidazolina sebagai Prekursor Senyawa Organik Radikal 2-(4-Piridil)-4,5-Dimetil Imidazolina-1-Oksil-3-Oksida Sutrisno , I Wayan Dasna, Parlan	893
Preparation And Characterisation Of Lanthanum (III) Selective Electrode Base 1,10-Diaza-4,7,13,16-Tetraoxacyclo-Octadecane-N,N'-Diacetic Acid As Ionophore Suyanta , Susanto Imam Rahayub, Buchari, Indra Noviandri	902
Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa dari Fraksi Aseton Talus Lichen <i>Ramalina Javanica</i> Nyl Suyanto , Suwarso, W.P, Kosela, S, Suwito, H, Winiati, S, Dai, Krohn, K.	908
Materials Science Using Neutron Powder Diffraction Takashi Kamiyama	911
Triterpenoid pentasiklik yang berkeaktifan antimalaria dari daun <i>Erythrina variegata</i> (Leguminosae) Tati Herlina , Agustono, Abdul Muis, Unang Supratman, Anas Subarnas, Supriyatna Sutardjo, Syafruddin, dan Hideo Hayashi	912
Isolasi Dan Identifikasi Suatu Limonoid Aphanamixin Dari Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan <i>Aphanamixis polystachya</i> (WALL) R. N. Parker (MELIACEAE) Tiaras Sinambela , Tukiran, Umi Syafa'ah, dan Kuniyoshi Shimizu	917
Kopolimerisasi Cangkok Asam Akrilat Pada Serat Rayon Dengan Teknik Pra-irradiasi Peroksida Tita Puspitasari , Yanti Sabarinah Soebianto dan Endang Asijati Ichsan	921

Pemetaan air masin dengan teknik geokimia air tanah di sekitar kolam ternakan udang harimau, Kerpan Kedah Umar Hamzah	926
Corrosion Behavior of Titanium Substrate During Deposition of Manganese Dioxide in Sulphuric Acid Electrolyte Wahyu Budi Utomo , Scott Donne	935
Microwave Chemistry: Semi-Synthesis Vanillin From Eugenol By Using Microwave Technique Wahyudi Priyono Suwarso , Siti Channah and Harry Kurniawan	945
Aplikasi Ruang Tutupan Pengekstrakan Mikro Fasa Pepejal Dalam Analisis Kompaun Meruap Pirazin dan Furan Semasa Pemprosesan Gula Kabung (<i>Arenga pinnata</i>) Wan Aida , W.M., Ho, C.W., Maskat, M.Y. & Osman, H.	953
Off-line Liquid-Liquid Extraction and Solid Phase Extraction and Online Pre-Concentration Micellar Electrokinetic Chromatography for Analysis of Organophosphorus Pesticides Wan Aini Wan Ibrahim , S. M. Monjurul Alam, A. B. Sulaiman	962
Alluvial Monazite from Tin Mining Areas of Peninsular Malaysia Wan Fuad Wan Hassan	970
The effect of sorption competition between heavy metals in soils Wan Zuhairi Wan Yaacob and Abdul Rahim Samsudin	976
Chemotaxonomic implication of the oligostilbenes and phenolic derivatives from <i>Vatica odorata</i> Wan Zuraida Wan Mohd. Zain, Sjamsul A. Achmad, Euis H. Hakim, Jalifah Latip, Nik Idris Nik Yusof and Yana M. Syah	982
The Effect of Palm Oil Vitamin E Supplementation on DNA Damage and Certain Immune Parameters in the Ageing Population Wan Zurinah Wan Ngah, Noor Aini Abdul Hamid, Azian Abdul Latiff, Zaiton Zakaria, Musalmah Mazlan, Johari Ibahim, Chin Siok Fong, Aminuddin Abdul Karim	985
Formulation OF EFFICIENT NPK Multi Fertilizer FOR VEGETABLE plants Based on Their Elements Migration: adsorbed into plant, deposited in soil and lost to Environment Wawang Suratno , Intan Asri1, Dini Faradila	991
Cytotoxic Oligostilbenoids from two Shorea plants Yana M. Syah , Sjamsul A. Achmad, Laily B Din, Emilio L. Ghisalberti, Euis H. Hakim, Lia D. Juliawaty, Jalifah Latip and Ikram M. Said	1000
Synthesis, Structures and Bioactivity of Some Diorganotin(IV) Bis(hydroxamates); Crystal Structures of $R_2Sn[o-NO_2C_6H_4CONR'O]_2$ (R= Me and Bu; R'= methyl and tolyl) Yang Farina , Elhadi Elbay Saad, Bohari M. Yamin, S. H. Inayat-Hussain, A. Mohd. Hasrol, Yip Foo Win, Ibrahim Baba, Abdul Hamid Othman, Ng Seik Weng, and A. Manaf Ali	1007
Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Jati <i>Tectona grandis</i> Yanty Maryanty , F. Madayanti, Akhmaloka	1020

Interfacial Adsorptions of Metal (II/III) Complexes of 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol by the High-Speed Stirring Spectrophotometry Yoki Yulizar dan Hitoshi Watarai	1023
Identifikasi korban musibah massal menggunakan sistem klasifikasi HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia Yoni F. Syukriani , Merlyn Surja, Endang S. Atimah 3, A. S. Noer	1028
Photodegradation of Ethylene in ETS-4 Yuni K. Krisnandi and Russell F. Howe	1036
Studi Komputasi Pengaruh Ligan Fluor Terhadap Pemecahan Orbital d pada Kompleks [Fe(F6)] ⁴⁺ Yusthinus T. Male , Djulia Onggo, Muhamad A. Martoprawiro, Ismunandar	1043
Sequencing 16S rRNA gene of Tibicinid cicada species (Homoptera) Badrul Munir Md-Zain, Vun Vui Fui, Azman Sulaiman & Zaidi M. Isa	1044
Ketoksikan Garam Ferosenium dan Kesannya ke Atas Parasit Malaria Zainal-Abidin B.A.H., Nurul Izza, N, Bohari. M Yamin.	1049
Aktivitas antibakteri cairan selom cacing tanah Pheretima sp. Zeily Nurachman , Fasade Miharja Beangi, Saepurahman	1057
Isolasi Trimiristin dari Limbah Hasil Pengolahan Minyak Pala Zuhrina Masyithah	1062

Nutritional Compostion And Sensory Evaluation Of Chicken Essence Abdul Salam Babji, Farah Nurshahida and Ch'ng Soo Ee	1080
The Chemistry and Materials of Polyurethane Synthesis Eli Rohaeti	1085
Karakterisasi Dna Polimerase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Lokal I N. Tika* , M.Sindumarta** dan Akhmaloka**	1090 1090
Pollution sources and their effects on drinking water quality: A case study of Semenyih River Basin Md Pauzi Abdullah and Soh Shiau Chian	1091
Analisis Sampel Partikulat Udara Menggunakan Metode K0 - Analisis Aktivasi Neutron Muhayatun	1092
Sertifikasi larutan standar logam, cadmium , timbal dan merkuri dengan metode titrasi kompleksometri EDTA Nuryatini dan Sumardi	1093
Comparison Of Equine Influenza Virus Purification By Ion Exchange Chromatography And Polyethylene Glycol Precipiation Sri Widarti	1102

Organic Synthesis Chemistry: The Problematical of Complex Target Molecules Umar A. Jenie	1110
Insecticidal Compounds from Indonesian Plants Unang Supratman , Tri Mayanti, Tati Herlina, Euis Julaeha, Nurlelasari, Desi Harneti, Hideo Hayashi	1118
Index Pengarang	1139

Isolasi, Pemurnian Dan Karakterisasi Katalase Dari Buah Apel (*Malus Sylvestris* Mill. Kultivar Rome Beauty) sebagai Biomaterial Sensor

A. A. Istri Ratnadewi¹⁾, Zulfikar²⁾, Muhammad Naqib³⁾

^{1, 2)} Kimia FMIPA, Universitas Jember
Jalan Kalimantan III/25 Jember, 68211, Indonesia
dewi_pjw2003@yahoo.com
zulfikar@yahoo.com

³⁾ Alumni Kimia FMIPA, Universitas Jember, Indonesia
naqib@yahoo.com

Abstrak

Katalase merupakan enzim oksidoreduktase yang mengkatalisis dua jenis reaksi, yaitu katalitik dan peroksidatik, dimana masing-masing mendekomposisikan hidrogen peroksida dan hidroperoksida. Aktivitas spesifik katalase diukur dengan satuan Unit/mg⁻¹. 1 Unit adalah kemampuan katalase untuk mendekomposisikan substrat 1 μmol hidrogen peroksida H₂O₂ dalam 1 menit pada kondisi pH 7 pada temperatur 30 °C. Katalase dapat diisolasi dari buah-buahan misalnya apel. Penelitian ini berorientasi pada pemanfaatan katalase sebagai biomaterial sensor, sehingga dibutuhkan katalase yang relatif lebih murni. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan memurnikan katalase yang dihasilkan dari buah apel (*Malus sylvestris* Mill. kultivar Rome Beauty) dan menentukan karakteristik (aktivitas, kadar protein serta temperatur dan pH optimum). Tahapan-tahapan yang telah dilakukan untuk memperoleh katalase murni, yang berturut-turut meliputi isolasi dari buah apel kultivar Rome Beauty, fraksinasi dengan metode presipitasi ammonium sulfat, dialisis menggunakan membran selofan, desalting dengan kolom Shepadex G-25, kemudian kromatografi kolom penukar ion DEAE-Selulosa. Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui berat molekul katalase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa katalase dari buah apel dapat diisolasi dengan aktivitas spesifik katalase hasil pemurnian sebesar 1046,93 (Unit/mg⁻¹), kadar protein 0,206 mg/ml⁻¹ serta temperatur optimum 50 °C dan pH optimum 8. Elektroforegram menghasilkan satu pita pada kisaran berat molekul 45.000–66.000 kD.

Kata Kunci : *Apel Rome Beauty, Katalase, Karakteristik Katalase, dan Elektroforegram*

1. Pendahuluan

Pesatnya penggunaan enzim dalam bidang analitik-medis, pangan, non pangan, dan farmasi menempatkan enzim sebagai bioaktif yang esensial untuk diproduksi. Katalase merupakan salah satu enzim yang telah diisolasi dari berbagai sumber seperti tumbuhan, hewan, mikroorganisme, dan metabolit. Isolasi katalase dari jaringan tumbuhan telah banyak dilakukan, termasuk isolasi katalase dari anggur (Kharizanov, 1974), tomat (Valenzula *et al.*, 1991), kentang (Bering, 1994), dan pir (Larrigaudiere *et al.*,

2001). Dalam jaringan suatu organisme, katalase dikenal karena kemampuannya mengkonversi hidrogen peroksida yang bersifat toksik terhadap sel menjadi molekul air dan oksigen. Pemanfaatan katalase berbagai sumber dengan kemurnian tinggi telah banyak dilakukan, terutama sebagai biomaterial sensor karena spesifitas dan produknya yang spesifik dan aman.

Katalase hasil isolasi masih memiliki tingkat kemurnian yang rendah karena kemungkinan adanya berbagai protein dan enzim-enzim lain

yang sifatnya hampir sama. Untuk memperoleh katalase dengan tingkat kemurnian yang tinggi, perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut menggunakan metode yang lebih spesifik. Pelaksanaan pemurnian masih dirasa sulit dan mahal sehingga informasi tentang metode pemurnian katalase dari buah apel masih sangat sedikit.

Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi katalase dari buah apel (*Malus sylvestris* kultivar Rome Beauty). Ekstrak kasar katalase hasil isolasi dimurnikan berturut-turut meliputi fraksinasi dengan metode presipitasi ammonium sulfat, dialisis dengan membran selofan, kromatografi kolom penukar ion dengan DEAE-Selulosa. Elektroforesis dilakukan untuk menentukan berat molekul. Pemanfaatan katalase murni dari buah apel sebagai biomaterial sensor merupakan suatu terobosan baru dan katalase yang dihasilkan akan lebih berguna bila dapat digunakan berulang-ulang dengan aktifitas dan reproduibilitas yang tetap tinggi. Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, terdapat beberapa permasalahan yang ingin diungkap, yaitu : (a) Penentuan aktivitas katalase hasil isolasi dan pemurnian, (b) Penentuan karakteristik katalase hasil isolasi dan pemurnian, yang meliputi pH dan temperatur optimum, (c) Penentuan kadar protein katalase hasil isolasi dan pemurnian.

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif pemanfaatan daging buah apel (*Malus sylvestris* Mill. kultivar Rome Beauty) sebagai sumber katalase yang potensial. Informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini akan dapat menjadi pedoman bagi pengembangan pemanfaatan katalase buah apel. Informasi mendasar tentang karakteristik enzimatis katalase juga dapat dimanfaatkan oleh para bioanalisis disektor industri maupun riset untuk mempelajari karakteristik katalase dan menganalisis hidrogen peroksida.

2. Percobaan

Tempat dan Bahan

Penelitian dilakukan di Pusat Penelitian Biologi Molekuler, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta laboratorium Pengendalian Mutu Pusat Pelatihan Bogasari Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Sampel yang digunakan adalah buah apel (*Malus sylvestris* Mill. kultivar Rome Beauty hasil budidaya Perkebunan Kusuma Agrowisata, Malang) yang dipetik pada kematangan komersial, sedangkan bahan yang digunakan adalah tris(hidroksimetilamino)metana, Na₂-EDTA, sodium dodesil sulfat (SDS), polivinilpirollidon (PVP, BM rata-rata 40000), gliserol 99 %, asam klorida (HCl), hidrogen peroksida (H₂O₂), *coomassie brilliant blue R-250* (CBB), ethanol (C₂H₅OH), asam fosfat (H₃PO₄), ammonium sulfat [(NH₄)₂SO₄], asam sitrat, natrium dihidrogenfosfat (NaH₂PO₄ · 2 H₂O), glisin, natrium hidroksida (NaOH), nitrogen cair, *bovine serum albumin* (BSA), *reagent-reagent* elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat dan standar protein (*marker*), air deionisasi, dan aquadest.

Isolasi Katalase

Sebanyak 30 gram daging buah apel segar dihaluskan menggunakan blender disertai penambahan pasir kuarsa dan nitrogen cair. Setelah halus kemudian dihomogenisasi dalam 90 mL buffer ekstraksi Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) yang mengandung polivinilpirollidon (PVP) 10%, gliserol 10%, Na₂-EDTA 0,5; 2,0 dan 5,0 mM. Homogenat disentrifugasi pada 15.000 gravitasi selama 15 menit. Ekstrak kasar katalase diambil dari supernatan dan digunakan pada tahap berikutnya. Aktifitas katalase diukur secara spektrofotometri

Fraksinasi Dan Dialisis Katalase

Protein dalam ekstrak kasar katalase dipresipitasi dengan penambahan larutan ammonium sulfat 0–100% (fraksi 0–40%, fraksi 40–60%, fraksi 60–85%, dan fraksi 85–100%) pada 0°C. Ekstrak pelet masing-masing fraksi kemudian ditentukan aktivitasnya secara spektrofotometri. Ekstrak pelet dengan aktivitas tertinggi kemudian didialisis selama 12 jam menggunakan kantong dialisis selofan. Hasil dialisis kemudian ditentukan aktivitasnya secara spektrofotometri

Penentuan Aktivitas Katalase Dengan Spektrofotometri

Penentuan aktivitas berdasarkan metode Cohen yang dimodifikasi (Graham dan Higgins, 1993) dilakukan pada 4°C.

Penentuan Kadar Protein Katalase

Penentuan protein dilakukan berdasarkan metode Bradford (Whitaker,1994) dengan standar *bovine serum albumin* (BSA).

Penentuan Temperatur dan pH Optimum

Penentuan temperatur optimum dan pH optimum dilakukan berdasarkan metode Cohen yang dimodifikasi (Graham dan Higgins, 1993).

Pemurnian Katalase dengan Kromatografi Penukar Ion

Tahapan pemurnian menggunakan kromatografi penukar ion dilakukan berdasarkan metode Prento dan Prento (1984).

3. Hasil dan Pembahasan

Enzim Katalase Hasil Isolasi

Pada tahap isolasi dilakukan langkah homogenisasi dengan buffer dan zat aditif merupakan langkah terpenting. Pada langkah ini, buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) yang mengandung PVP, gliserol, dan zat aditif dihomogenisasi bersama dalam blender, dimana masing-masing memiliki fungsi berbeda yang dibutuhkan enzim dalam medium barunya.

Tris-HCl sebagai buffer akan mempertahankan pH ekstrak sekitar 8,5. Hal ini berkaitan dengan terlepasnya asam-asam fenol yang akan menyebabkan penurunan pH ekstrak. Walaupun pH 8,5 bukan merupakan pH optimum katalase namun pH tersebut termasuk kisaran pH aktif katalase dalam mendekomposisi substratnya.

Sampel berupa jaringan daging buah apel sangat rentan terhadap perubahan warna (*browning*). Perubahan warna ini diakibatkan oleh adanya kerusakan jaringan yang menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas metabolisme *in vivo*. Adanya oksigen diudara terbuka juga akan menimbulkan reaksi

senyawa-senyawa fenolat atau polifenol yang dikatalisis enzim. Fenol dalam vakuola dapat bertindak sebagai substrat bagi reaksi polifenol oksidase (enzim utama penyebab *browning*) apabila jaringan pembatas vakuola mengalami kerusakan. Inaktivasi senyawa fenolat (polifenol) selama isolasi enzim sangat penting dilakukan untuk menghasilkan enzim tanaman dalam keadaan *native* (Beevers, 1991). Pada penelitian ini dilakukan upaya untuk mengikat senyawa-senyawa fenol atau polifenol melalui penambahan absorben kedalam medium homogenisasi. Penambahan PVP (BM rata-rata 40.000) sebagai suatu polimer sering digunakan untuk mengikat senyawa-senyawa fenol dan untuk meminimalkan koagulan kloroplas (Waters *et al.*, 1982; Siebert, 1999) dalam campuran reaksi tersebut, yang ternyata efektif dalam menginaktivasi senyawa-senyawa fenol.

Zat aditif selalu ditambahkan pada setiap proses isolasi untuk melindungi komponen-komponen enzim dari inaktivasi. EDTA adalah zat aditif yang sering ditambahkan pada proses homogenisasi, karena buffer yang digunakan dalam isolasi suatu enzim lebih baik mengandung kelator logam berat seperti EDTA (Beevers, 1991; Sugiharto, 1998). Dalam penelitian ini konsentrasi EDTA sebagai garamnya, Na₂-EDTA divariasi antara 0,5; 2,0 dan 5,0 mM. Hal ini sesuai dengan Scopes (1982) yang menyebutkan bahwa EDTA dapat digunakan pada konsentrasi antara 0,1–5,0 mM. Na₂-EDTA adalah pengkelat yang sering digunakan karena selain sebagai kelator kuat juga memiliki affinitas yang non spesifik untuk beberapa logam. Berdasarkan tabel berikut tampak bahwa penggunaan EDTA 0,5 mM akan menurunkan aktivitas katalase sebesar 44,427% bila dibandingkan dengan ekstrak kasar katalase tanpa zat aditif apapun. Aktivitas katalase meningkat sebesar 4,336%

Tabel 1. Aktivitas Relatif Katalase Pada Berbagai Konsentrasi Na₂-EDTA

Konsentrasi (mM)	Aktivitas Relatif (%) ¹
0,0	100,000
0,5	55,5730
2,0	104,336
5,0	38,6450

¹Aktivitas relatif merupakan prosentase rasio aktivitas ekstrak kasar katalase + Na₂-EDTA terhadap ekstrak kasar katalase tanpa Na₂-EDTA (non aditif)

Tabel 2. Aktivitas Dan Kadar Protein Fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0–100%

Fraksi	Vol. (ml)	A (unit)	A. T. (unit.ml ⁻¹)	K. P. (mg.ml ⁻¹)	A. S. (unit.mg ⁻¹)	Hasil (%)	F. K.
E. K	100,0	2610,957	26,110	1,641	15,912	100,000	1,000
0–40	45,6	959,6490	21,045	1,228	17,137	74,840	1,077
40–60	38,3	1496,213	39,066	1,522	25,670	92,7450	1,613
60–85	20,5	2624,334	128,016	2,093	61,145	127,596	3,843
85-100	15,1	1273,263	84,238	1,409	59,780	85,8780	3,757

E.K. : ekstrak kasar katalase + disodium EDTA 2,0 mM
A, A.T., K. P., A. S., F. K. masing-masing adalah aktivitas, aktivitas total, kadar protein, aktivitas spesifik, dan factor kemurnian

Tabel 3. Data Pemurnian Katalase Apel Rome Beauty

J.P.	Vol. (ml)	A (unit)	A. T. (unit.ml ⁻¹)	K. P. (mg.ml ⁻¹)	A. S. (unit.mg ⁻¹)	Hasil (%)	F. K.
E. K	100,0	2610,957	26,110	1,641	15,912	100,000	1,000
Fraksi 60-85%	20,5	2624,334	128,016	2,093	61,145	127,596	3,843
Dialisat	9,0	2492,051	276,895	1,443	191,868	87,951	12,058
Kat. Des-Sephadex G-25	8,5	425,17	50,020	0,214	233,738	13,041	14,689
Kat. Murni-DEAE-Selulosa	1,50	323,500	215,670	0,206	1046,93	32,190	65,795

J.P. : Jenis perlakuan
E. K : ekstrak kasar katalase + disodium EDTA 2,0 mM
Dialisat : katalase (+ disodium EDTA 2 mM) hasil dialisis
Kat. Des- : katalase hasil desalting
Kat. Murni : katalase murni hasil kromatografi
A, A.T., K. P., A. S., F. K. masing-masing adalah aktivitas, aktivitas total, kadar protein, aktivitas spesifik, dan faktor kemurnian

pada penggunaan $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2 mM dan berkurang hingga 61,355% pada konsentrasi $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 5,0 mM. Tabel 1 menunjukkan aktivitas katalase pada konsentrasi EDTA yang digunakan.

Berdasarkan tabel tersebut tampak bahwa pada konsentrasi $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ yang rendah (0,5 mM) menyebabkan penurunan aktivitas katalase. Pada konsentrasi ini, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ hanya bertindak sebagai inhibitor metallo-protease, karena dalam fungsi ini $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ yang dapat digunakan antara 0,1–1,0 mM (Deutscher, 1990), sedangkan fungsi kelat logam $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ yang tidak dominan menyebabkan penurunan aktivitas katalase. Pada konsentrasi 2,0 mM tampak terdapat peningkatan aktivitas katalase. Hal ini kemungkinan merupakan

konsentrasi $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ yang dibutuhkan katalase sebagai metallo-protease dan pengkelat logam-logam yang terdapat pada tahap isolasi. Aktivitas yang lebih rendah terjadi pada konsentrasi $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ yang lebih tinggi (5,0 mM). Hal ini dihubungkan dengan kemampuan $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ sebagai *sequester* logam. Katalase yang dalam formasi aktifnya mengandung besi kemungkinan mengalami *sequester* oleh EDTA, yang menyebabkan penurunan aktivitas ekstrak kasar katalase, dengan mempertimbangkan affinitas EDTA yang non spesifik.

EDTA telah diketahui sebagai *sequester* kation divalen sehingga dapat menyingkirkan ion tembaga(II) dari jaringan selama isolasi (Gong *et al.*, 2000). Oleh karena itu tiga hal yang

cukup penting dalam penambahan $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ini berkaitan dengan kemampuannya sebagai inhibitor *browning* (Sapers *et al.*, 1984), inhibitor metallo-protease (Deutscher, 1990; Bollag dan Edelstein, 1991), dan *sequester* logam-logam inhibitor katalase [terutama ion tembaga(II)] (Kocsis dan Hanson, 2000; Gong *et al.*, 2000).

Katalase Hasil Fraksinasi

Pada penelitian ini, purifikasi awal dilakukan melalui fraksinasi menggunakan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fraksinasi adalah presipitasi ekstrak kasar dengan konsentrasi bertingkat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0–100% jenuh. Pada tahap ini terdapat pula proses resuspensi dan sentrifugasi tambahan pembentukan pellet yang akan menyebabkan pemecahan organel sel (Beevers, 1991). Tabel 2. menunjukkan bahwa aktivitas dekomposisi tertinggi diperoleh pada fraksi 60–85%. Apabila dibandingkan dengan ekstrak kasar maka katalase yang diperoleh pada fraksi 60–85% ini memiliki tingkat kemurnian lebih

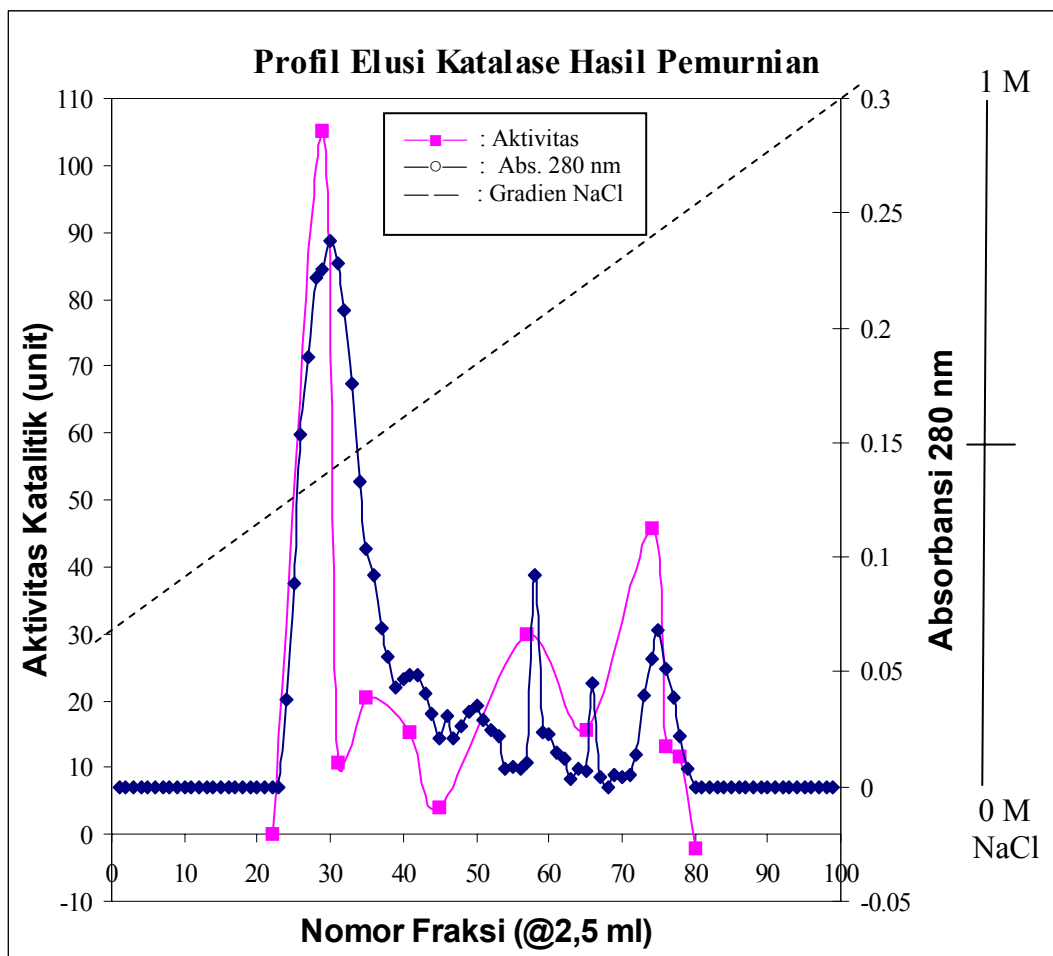
tinggi. Berdasarkan hal tersebut maka fraksi 60–85% dipilih untuk dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut pada tahap dialisis. Tabel 2 menunjukkan aktivitas dan kadar protein fraksi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Katalase Hasil Dialisis

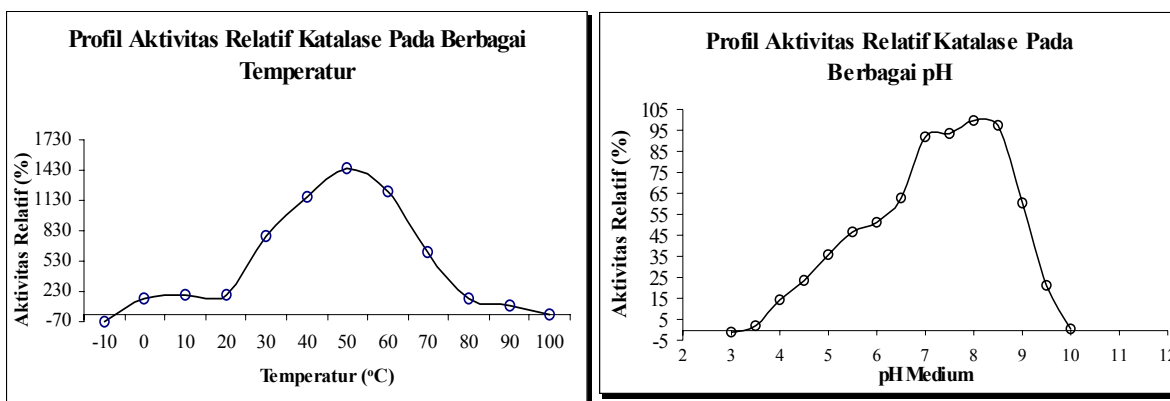
Tahap dialisis dilakukan pada temperatur 0–8°C. Pellet fraksi 60–85% yang telah disuspensi ke dalam buffer diinjeksikan ke dalam kantung dialisis. Aktivitas dan kadar protein suspensi fraksi 60–85% dan katalase hasil dialisis diberikan pada tabel 3.

Katalase Hasil Pemurnian Dengan Penukar Anion

Pemurnian dengan penukar anion DEAE-Selulosa didasarkan pada terdapatnya perbedaan pH isoelektrik dari enzim atau protein yang terdapat pada fraksi hasil desalting Sephadex G-25. Katalase diikatkan pada matriks kolom DEAE-Selulosa dengan buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0). Proses elusi selanjutnya juga dilakukan menggunakan



Gambar 1. Profil elusi katalase pada pemurnian dengan kromatografi penukar anion



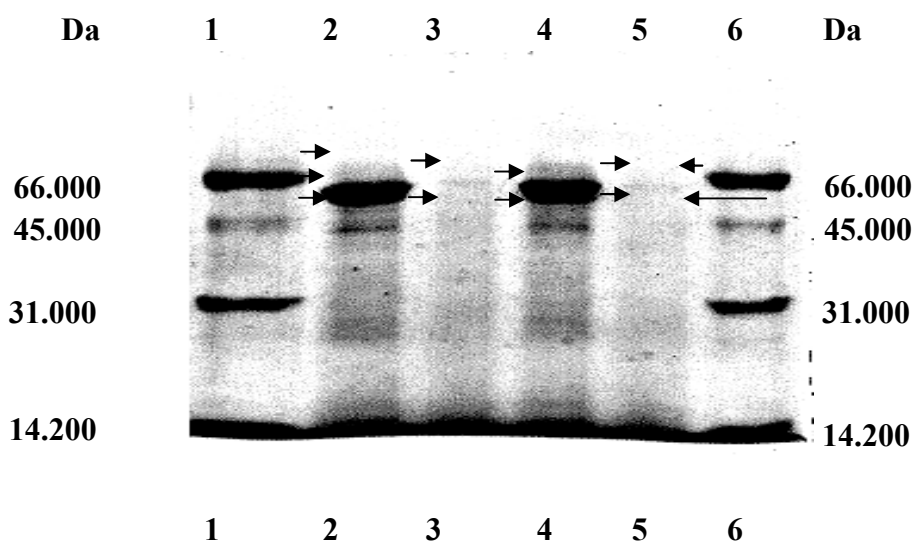
Gambar 2. a. Profil aktivitas relatif katalase pada berbagai pH; b. Profil aktivitas relative katalase pada berbagai temperatur

buffer awal Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) yang diberikan gradien konsentrasi satu tahap NaCl 0-1 M untuk melepas protein enzim secara selektif maupun protein lain yang kemungkinan masih terikat pada matriks kolom. Profil elusi yang dihasilkan ditunjukkan pada gambar 1. menggunakan eluen gradien konsentrasi NaCl 0-1 M dalam buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7).

Pada gambar tersebut tampak bahwa hasil pengukuran absorbansi pada 280 nm terhadap fraksi hasil elusi menunjukkan adanya empat puncak (peak) protein yaitu pada fraksi 24-39, fraksi 57-59, fraksi 65-67, dan fraksi 71-79. keempat puncak tersebut kemudian dilakukan penentuan aktivitas katalitiknya menggunakan substrat hidrogen peroksida H₂O₂. hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi 24-39

atau puncak yang pertama ternyata menunjukkan adanya aktivitas katalitik. Fraksi yang menunjukkan adanya aktivitas tersebut kemudian dikumpulkan yang selanjutnya dilakukan dialisis dalam buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0). Data pemurnian ditunjukkan pada tabel 3.

Fraksi katalase hasil kromatografi penukar anion ini dianggap telah bersifat murni karena hasil pemisahannya menunjukkan aktivitas spesifik 65,8 kali lebih besar daripada fraksi ekstrak kasar. Aktivitas spesifik yang dihasilkan merupakan rasio unit katalase terhadap jumlah protein yang dimiliki. Aktivitas enzim berhubungan dengan tingkat kemurnian, sehingga makin tinggi tingkat kemurnian enzim maka besarnya aktivitas spesifik akan bertambah.



Gambar 3. Elektroforegram protein katalase. Lajur 1 dan 6 : marker, lajur 2 dan 4 : katalase (30 µg), lajur 3 dan 5 : katalase (20 µg)

Temperatur Optimum Katalase

Kondisi temperatur berkaitan erat dengan faktor-faktor yang mempengaruhi mekanisme kerja suatu enzim, yaitu energi aktivasi dan stabilitas enzim. Berdasarkan gambar 2a, pada temperatur antara -10 hingga kurang dari 50°C (temperatur rendah) katalase belum memiliki energi aktivasi yang memadai untuk memulai reaksi dekomposisi hidrogen peroksida, sehingga dekomposisi tersebut tidak dapat berlangsung dengan sempurna yang ditandai dengan aktivitas katalase yang rendah.

Pada kondisi temperatur optimum 50°C katalase telah memiliki energi yang cukup untuk memulai reaksi dekomposisi sehingga reaksi dapat berlangsung dengan sempurna. Dengan kata lain energi yang diperoleh katalase sama dengan energi aktivasi yang dibutuhkan untuk mendekomposisi hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen.

Kondisi temperatur yang lebih tinggi yaitu lebih dari 50 hingga 100°C (diatas temperatur optimum) dapat menyebabkan ketidakstabilan katalase. Hal ini berkaitan erat dengan kelarutan dan perubahan konformasi katalase dalam larutan.

pH Optimum Katalase

Kondisi pH dalam pengujian aktivitas katalase ditentukan antara pH $3,0$ hingga $10,0$ dengan interval $0,5$ satuan pH berdasarkan aktivitas minimum pada keadaan asam dan basa. Gambar 2b. menunjukkan bahwa perubahan pH medium dapat mempengaruhi aktivitas katalase secara *in vitro*. Peningkatan pH dimulai dari $3,0$ hingga pH $8,0$ menyebabkan aktivitas katalase juga meningkat dan selanjutnya mengalami penurunan aktivitas pada pH diatas $8,0$. Berdasarkan rentang tersebut diketahui bahwa katalase memiliki kisaran pH yang lebar, sehingga di luar rentang tersebut dapat dipastikan katalase tidak akan aktif sama sekali.

pH optimum ini merupakan salah satu karakteristik katalase yaitu katalase memiliki kelarutan pada pH $8,0$ dan jumlah ion-ion pada

pH tersebut membuat konformasi katalase tepat berpasangan dengan konformasi substratnya.

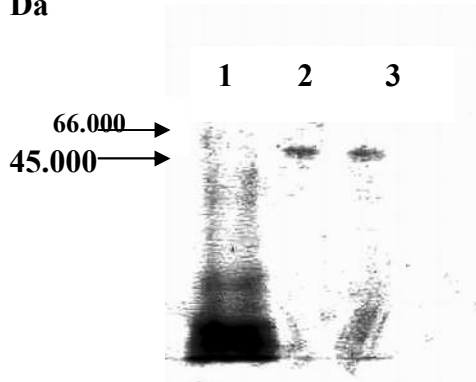
Visualisasi Elektroforesis Katalase

Elektroforesis dilakukan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul akibat pengaruh filtrasi gel. Pada pengamatan terhadap pita dengan injeksi untuk $20\ \mu\text{g}$ ternyata menunjukkan pita dengan intensitas yang lemah. R_f yang dihasilkan masing-masing sebesar $0,306$ dan $0,429$. Pada injeksi $30\ \mu\text{g}$ untuk katalase yang sama menunjukkan pita dengan intensitas kuat dan memiliki R_f sebesar $0,265$, $0,306$, dan $0,429$. Intensitas pita yang dihasilkan menunjukkan adanya pita selain protein yang dimaksud. Pita ini diduga sebagai pemunculan protein selain katalase yang masih terdapat dalam larutan.

Bila ditinjau berdasarkan berat molekulnya, tampak bahwa katalase hasil dialisis mengalami disosiasi menjadi sub unit dengan berat molekul yang lebih kecil. Katalase apel merupakan enzim tetramer dengan berat molekul sub unit berkisar $53.000-65.000$ Dalton. Pada penelitian ini berhasil diperoleh katalase dengan berat molekul berkisar sebesar $46.431,67-65.894,16$ Dalton, seperti tampak pada gambar 3. Hal ini dimungkinkan sebagai akibat penggunaan SDS dalam elektroforesis, yang berperan mendisosiasi protein enzim terintegrasi.

Katalase hasil pemurnian mengalami disosiasi menjadi sub unit dengan berat molekul yang lebih kecil. Katalase ini merupakan enzim tetramer dengan berat molekul sub unit berkisar $53.000-65.000$ Dalton. Pada penelitian ini berhasil diperoleh katalase dengan berat molekul berkisar sebesar $45.000-66.000$ Dalton, seperti tampak pada gambar 4. Satu pita yang tampak tersebut menunjukkan bahwa pemurnian dengan kromatografi penukar anion DEAE-Selulosa telah mampu menghasilkan katalase apel dengan tingkat kemurnian yang cukup tinggi.

Da



Gambar 4. Elektroforegram protein katalase. Lajur 1: marker, lajur 2 dan 3 : katalase hasil pemurnian (20 µg).

4. Kesimpulan

Ekstrak kasar katalase berhasil diisolasi dari daging buah apel varietas Rome Beauty dengan aktivitas total sebesar 26,110 unit.ml⁻¹ dan kadar protein 1,641 Unit.mg⁻¹.

Purifikasi parsial awal yang dilakukan menggunakan (NH₄)₂SO₄ 60–85% jenuh dapat meningkatkan aktivitas total ekstrak kasar katalase (+ Na₂- EDTA 2,0 mM). Hal ini ditandai dengan aktivitas total yang dihasilkan hingga 128,016 unit.ml⁻¹ dan kadar protein sebesar 2,094 mg.ml⁻¹. Aktivitas total tersebut akan meningkat pada penggunaan dialisis pada tahap purifikasi parsial berikutnya, yaitu sebesar 276,895 unit.ml⁻¹ dan menghasilkan kadar protein 1,443 mg.ml⁻¹.

Katalase apel hasil dialisis memiliki karakteristik enzimatik meliputi temperatur optimum sebesar 50 °C dan optimum pada pH 8,0. Penggunaan SDS-PAGE untuk mengetahui homogenitas protein hasil dialisis menghasilkan berat molekul protein katalase hasil dialisis, yaitu sebesar 46.431,67–65.894,16 Dalton atau merupakan berat molekul sub unit monomer katalase.

Katalase berhasil dimurnikan dari daging buah apel varietas Rome Beauty dengan aktivitas total sebesar 215,670 unit.ml⁻¹ dan kadar protein 0,206 unit.mg⁻¹. Penggunaan SDS-PAGE untuk mengetahui homogenitas protein hasil dialisis menghasilkan berat molekul protein katalase hasil dialisis, yaitu sebesar 45.000-66.000 Dalton atau merupakan berat molekul sub unit monomer katalase.

5. Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dilaksanakan dengan sumber dana Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar DP3M Dirjen DIKTI DEPDIKNAS tahun anggaran 2004. Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya penelitian ini, antara lain Lembaga Penelitian Universitas Jember, para Kepala dan Staf laboratorium yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas laboratoriumnya untuk menunjang penelitian ini, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

6. Daftar Pustaka

- Beevers, H. (1991). Metabolic Compartmentation in Plant Cells. In : Society for Experimental Biology. Compartmentation of Plant Metabolism in Non-Photosynthetic Unit Tissue. Seminar Series : **42**, Emes, M. J. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-21.
- Bollag, D. M., and S. J. Edelman, (1991). Protein Methods. Wiley-Liss A John Wiley & Sons, Inc. Publication, New York
- Bering, C. L., (1994). Enzymes. A Workshop for Secondary School Students, J. Chem. Educ., **71** (3), 241.
- Deutscher, M.P., (1990). Maintaining Protein Stability. In : Methods in Enzymology, **182**. Guide to Protein Purification, Deutscher, M. P. (Ed.), Academic Press, San Diego, pp. 83-85.
- Gong, Y., P. M. A. Toivonen, P. A. Wiersma, C. Lu, and O. L. Lau, (2000). Effect of Freezing on the Activity of Catalase in Apple Flesh Tissue, J. Agric. Food Chem., **48** (11), 5537–5542.
- Graham, J. M., and Higgins, J. A., (1993). Isolation and Analysis: The Identification of Subcellular Fractions from Mammalian Cells. In : Methods in Molecular Biology Biomembrane Protocols : I. Isolation and Analysis, **19**, Graham, J. M., and Higgins, J. A. (Ed.), Humana Press, Totowa, pp. 1-18.
- Kharizanov, A., (1974). A Morfological Studies on Erythroneura arboridia adenae vitisuga, Rev. Appl. Entomol. A-Agric., **62** (2), 133.
- Kocsis, M. G., and Hanson, A. D., (2000). Biochemical Evidence for Two Novel Enzymes in the Biosynthesis of 1-Dimethylsulfonicpropionate in Spartina alterniflora, Plant Physiol., **123** (3), 1153–1161.
- Larrigaudiere, C., E. Pinto, I. Lenthalic, and M. Vendrell, (2001). Involvement of Oxidative Processes in the Development of Core Browning in

A. A. Istri Ratnadewi , Zulfikar , Muhammad Naqib

- Controlled-Atmosphere Stored Pears, Hort. Sci. Biotechnol., **76** (2), 157–162.
- Prento, P., and A. Prento, (1984). Crystalline Catalase from the Earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta : Annelida); Purification and Properties, Comp. Biochem. Physiol., **77B** (2), 325–328.
- Sapers, G. M., Miller, R. L., Miller, F. C., Cooke, P. H., and Choi, S. -W., (1994). Enzymatic Browning Control in Minimally Processed Mushrooms, J. Food Sci., **59** (5), 1042–1047.
- Scopes, R. K., (1982). Protein Purification. Principles and Practice, Springer-Verlag: New York.
- Siebert, K. J., (1999). Effect of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis : Reviews, J. Agric. Food Chem., **47** (2), 353-362.
- Sugiharto, B., dan T. Handoyo, (1998). Workshop Nol Dasar-Dasar Biologi Molekuler: Petunjuk Analisis Pada Workshop Dasar-Dasar Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember, Jember, hal. 1–7.
- Valenzuela, J. L., A. Sánchez, and L. Romero, (1991). Physiological Plant Age Dependent Biochemical Indicators and Physiological Parameters of Iron Nutrition. In : Proceedings of The Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants : Iron Nutrition and Interactions In Plants, **43**, Chen, Y., and Y. Hadar. (Ed.), Kluwer Academic Publishers Dordrecht, pp. 107 – 116.
- Waters, S. P., Noble, E. R., and Dallig, M. J., (1982). Intracellular Localization of Peptide Hydrolases in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves, Plant Physiol., **69** (3), 575–579.
- Whitaker, J. R., (1994). Principles of Enzymology for The Food Sciences. Marcel Dekker, Inc., New York



Kemungkinan Penggunaan Sponge (Porivera) sebagai Bioindikator Pencemaran Logam dalam Lingkungan Laut

A. Netty Siahaya¹⁾

1) Jurusan Kimia, Universitas Pattimura
Jl. Dr. Tamaela Kampus PGSD, Ambon, Indonesia

Abstract

Analysis of metals Pb, Cr and Cd in some tissues of sponge species (Stylissa certaria, Pseudoretina purpures and Stylissa massa) has been carried out in three reef platform zones in Spermonde archipelago south west Sulawesi waters. First zone was strongly influenced by off shore waves. It was found that at zone-1, metal Pb concentration is highest 12,19 mg.kg dry weight in tissue of Stylissa certaria. Concentration of Cr was found possibility of using sponge as bioindicator in pollutant monitoring in marine environment with high diversity in reef platform waters.

Paper is not available

Paradigma Alternatif Dalam Analisa DNA Mitokondria Manusia

A.S. Noer dan Yoni F Syukriani

Departement Kimia FMIPA,
dan Pusat Bioteknologi
Institut Teknologi Bandung, Indonesia

Abstrak

Asam deoksiribonukleat (DNA) sebagai molekul pembawa informasi genetik pada manusia terdapat pada inti sel dan mitokondria. Seluruh urutan nukleotida baik yang terdapat dalam mitokondria maupun inti sel telah berhasil ditentukan. Secara kuantitatif jumlah nukleotida mitokondria hanya sekitar seperduaratus ribu dibandingkan dengan jumlah nukleotida inti sel. Perbedaan lain antara keduanya adalah DNA mitokondria (mtDNA) diwariskan dari pihak ibu sedangkan untuk DNA inti sel diketahui setengah berasal dari ibu dan setengah lainnya berasal ayah. Kedua fenomena yang dimiliki DNA mitokondria di atas, ukurannya yang kecil dan pola pewarisan dari garis ibu, telah menarik perhatian para ilmuwan untuk mengetahui lebih jauh mengenai hubungan antara genotipe dan fenotipenya. Hasil yang diperoleh di antaranya adalah didapatkannya informasi bahwa mutasi tertentu pada DNA mitokondria menyebabkan suatu penyakit, dan adanya pola keterkaitan antara posisi/jenis nukleotida (polimorfisme) dengan kelompok tertentu dalam populasi. Namun disayangkan sampai saat ini belum ada suatu telaah DNA mitokondria yang secara khusus berdasarkan genotipe tanpa dikaitkan dengan fenotipenya. Hasil yang telah diperoleh berdasarkan analisa data urutan nukleotida mtDNA menunjukkan bahwa dua individu yang etnisnya berbeda mempunyai mtDNA yang keseluruhannya sama, sedangkan polimorfisme mtDNA terdapat pada individu-individu yang secara etnis sama. Fenomena yang didapatkan ini tidak sesuai dengan pola pikir yang ada, yaitu selalu mencoba mencari hubungan antara genotipe dan fenotipe mtDNA. Kenapa dalam hal ini genotipe mtDNA tidak berkaitan dengan etnisnya dapat dijelaskan dengan mempertimbangkan bahwa mtDNA hanya sebagian kecil, hanya sekitar seperduaratus ribu, dari total informasi genetik pada manusia. Migrasi populasi manusia dapat ditelusuri melalui mtDNA, atau kromosom Y, namun pola genotipe tidaklah harus selalu berkaitan kelompok populasi. Atas dasar hal-hal di atas dan beberapa hasil lainnya yang telah diperoleh, diharapkan paradigma alternatif dalam analisa mtDNA manusia, yaitu telaah yang khusus hanya berdasarkan genotipe, dapat mengungkap lebih banyak lagi fenomena yang sampai saat ini belum diketahui.

masa depan.

Paper is not available

Production And Quality Of Chitosan Extracted From Fungi

Dawn Carmel Paul, Kalaivani Nadarajah, Abdul Jalil Abdul Kader

School of Biosciences and Biotechnology
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan

Abstract

Not available

1. Introduction

Chitosan is a non-toxic, biodegradable, biocompatible and highly polycationic biopolymer comprising of (1,4)-linked amino-deoxy- β -D-glucan. It is rarely found in nature and is found primarily as the main component of the fungal cell wall, especially in Zygomycetes (Arcidiacono & Kaplan 1992). At present, chitosan is commercially extracted from the exoskeleton of crustaceans using strong alkali. However, this harsh extraction process, together with the variability in source material leads to inconsistent physicochemical characteristics. Physical properties of chitosan extracted directly from fungi can be manipulated by control of factors such as growth media composition in fermentation and processing parameters in the extraction protocol (Arcidiacono & Kaplan, 1992; Jaworska & Konieczna, 2001). The degree of deacetylation and molecular weight dictates the behaviour of chitosan (Arcidiacono & Kaplan, 1992). Chitosan has a massive range of applications in industries such as cosmetics, pharmaceutical, textile, food, biotechnology and agriculture. The absence of allergenic proteins which are associated with crustacean chitosan makes fungal chitosan a suitable candidate as a food preservative.

This study aims to compare the chitosan production of local fungal isolates grown on different growth media and to increase fungal

chitosan production through modifications of the extraction protocol developed by White *et al.*, (1979). Quality analyses were performed to determine the degree of deacetylation, molecular weight and colour of the chitosan produced.

2. Materials and Methods

Fungi and culture medium

This study was conducted on three local fungal (Zygomycete) isolates designated as *Absidia* sp. DR, *Absidia* sp. 2a1 and *Rhizopus* sp. which were obtained from the culture collection of the school of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Three growth media, YPG (yeast extract 3gm/l, peptone 10gm/l, glucose 10gm/l and 1 ml/l trace elements), BG (nutrient broth 8gm/l; yeast extract 0.1gm/l; glucose 5gm/l; KCl 0.1gm/l; MgSO₄.7H₂O 0.25gm/l; MnCl₂.4H₂O 0.002gm/l and FeSO₄.7H₂O 0.00029 gm/l), and TVB (glucose 20gm/l; (NH₄)₂SO₄ 1.4gm/l; KH₂PO₄ 2 gm/l; CaCl₂ 0.3gm/l; MgSO₄.7H₂O 0.3gm/l; molybdic acid 85% 0.01gm/l and 1ml/l trace elements (per 500ml: FeSO₄.7H₂O [5gm], ZnCl₂ [1.66gm], CoCl₂.6H₂O [2gm], MnSO₄.7H₂O [1.96gm] and hydrochloric acid 12 M [10ml]) were prepared. All three growth media were autoclaved at 110°C, 15 psi for 10 minutes. Growth media were prepared as 195ml aliquots in 500ml Erlenmeyer flasks

(Arcidiacono & Kaplan 1992). Inocula was prepared aseptically by adding sterilized distilled water onto the fungal mycelia grown on potato dextrose agar plates (PDA) and then carefully scraping the spores from the mycelia using a stab wire. Spore suspension was filtered into a sterilized flask and spore count was performed using a haemocytometer (Improved Neubauer, 0.100 mm deep, brightline Hemacytometer, USA). The spore suspension was prepared as 1×10^7 spores/ml. 5 ml of spore suspension was inoculated into every flask. The fungi were grown as submerged batch cultures at 30°C and with agitation of 150 rpm for 96 hours. Cultures were harvested at 12-hour intervals.

Extraction

The fungal biomass obtained from each 12-hour sampling point were dried in a freeze dryer (Labconco Model 216004) and weighed. Lyophilized fungal biomass were then subjected to chitosan extraction protocol employing the standard method of White *et al.* (1979). For the optimization of the extraction protocol, 60-hour old *Absidia* sp. DR biomass grown on YPG medium were freeze-dried and subjected to modified alkaline and acid treatments in the White *et al.* method of extraction (1979). Three different acids, acetic acid (AA) formic acid (FA) and hydrochloric acid (HCl) were used as the extracting solution. Acid treatment were performed at acid concentration 2%, 6% and 10%; incubation period 3, 6 and 12 hours; temperature 60°C and 95°C.

Quality and statistical analysis

The degree of deacetylation was determined by the first derivative UV spectrophotometry method (FDUVS) (Muzarelli & Rochetti, 1985). The degree of deacetylation for the chitosan samples was determined based on calculations for the percentage of the glucosamine content in the samples (Muzarelli & Rochetti, 1985). The average molecular weight was resolved using the intrinsic viscosity method (Rege & Block, 1999). Curves for $\eta_{sp}/\text{concentration}$ versus concentration (whereby η_{sp} - specific viscosity) were plotted and extrapolated in order to obtain the intrinsic viscosity, $[\eta]$ ($[\eta] = [\eta_{sp}/c]_{c \rightarrow 0}$). The average molecular weight was then calculated using the Mark-Houwink equation:

$$[\eta] = KM^a$$

whereby K and a are coefficients related to the the Ubbelohde tube and the molecular weight of sample. The colour of chitosan was assessed using a chromameter (Minolta Model CR300, Japan) and the Hunter values for lightness (L) was recorded (Roberts, 1992). Data obtained was analyzed statistically using the Jandel Scientific SigmaStat statistical package.

3. Results and Discussion

Fungal Growth and chitosan production

In general, all three isolates exhibited the best growth on YPG (Figure 1), followed by BG and TVB. There was no significant difference between the biomass and chitosan production for *Absidia* sp. DR and *Absidia* sp. 2a1. However the average production of chitosan for both isolates grown on YPG were 56.85% higher than the chitosan production of *Rhizopus* sp. grown on the same medium ($P < 0.05$) (Figure 1).

Chitosan production was also significantly higher for fungi grown on YPG as compared to BG and TVB ($P < 0.05$) (Figure 2). This study is in agreement with the fact that high biomass yields result in high chitosan production (Jaworska & Konieczna 2001). Among the three media utilized, YPG was found to contain the highest amount of nitrogen, 1.69gm/l of peptone, and yeast extract. Followed by TVB with 1.4gm/l of NH_4SO_4 and 1.24gm/l of nutrient broth and yeast extract in BG. According to Andrade *et al.* (2000), high nitrogen content increases the synthesis of enzymes involved in chitin biosynthesis. Therefore the highest yield from YPG was expected due to its high nitrogen content as compared to TVB and BG. Based on the absolute values obtained in this study, *Absidia* sp. DR produced 18% chitosan/biomass (60 hours), which was the highest amount of chitosan followed by *Absidia* sp. 2a1 and *Rhizopus* sp.

In the duration of the 96 hours, the mycelial biomass increased with the incubation period. The extractability of chitosan increased with the increment of biomass until the 60th or the 72nd hour of culturing whereby the fungi is in the late exponential phase of growth and the highest amount of chitosan is extracted. Beyond this time point, chitosan extraction exhibited a gradual decrease although fungal

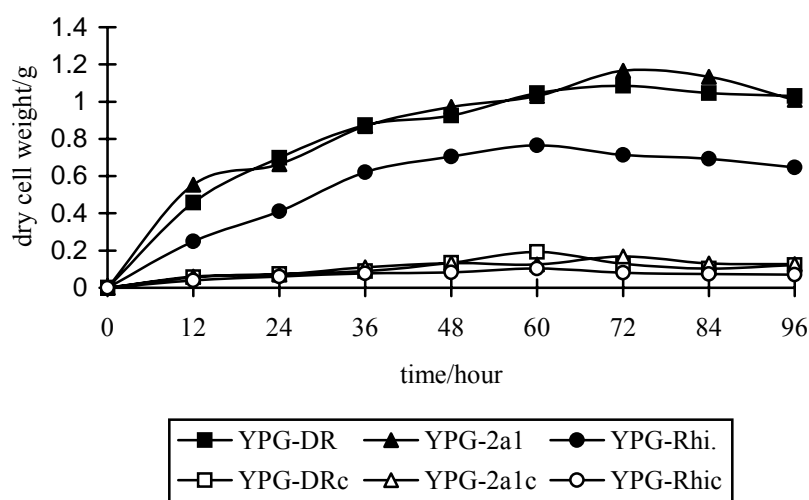


Figure 1 Profile of biomass and chitosan production from fungi grown on YPG.

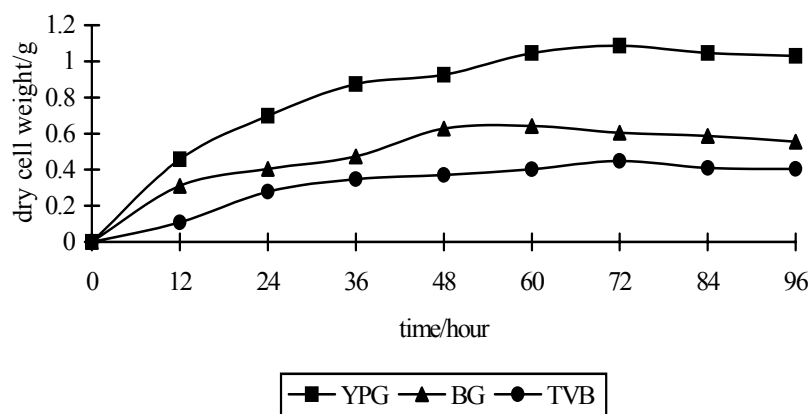


Figure 2 Profile of *Absidia* sp. DR biomass grown on different growth media

biomass continued to increase (Tan *et al.* 1996). This is attributed to the strong binding of chitin and chitosan to other cell wall components (Tan *et al.* 1996).

Extraction

In the alkaline treatment, five incubation period and three incubation temperature were used (Table 1). It was observed that significantly higher amount of chitosan was extracted with the increase of incubation period and temperature ($P < 0.05$). The highest yield of chitosan was obtained at incubation temperature 121°C and incubation period 30 minutes (19.7% chitosan/biomass).

In the acid treatment, it was observed that the utilization of acetic acid and formic acid as the extracting solution yielded higher amounts of chitosan as compared to hydrochloric acid. The

highest chitosan yield was obtained with formic acid 6% at incubation period 12 hours and temperature 95°C (Figure 3). This study also observed that the same incubation period, temperature and acid concentration rendered different effects and interactions when different acids were used as the extracting solution. For example, in the utilization of acetic acid, it was found that only the incubation period played a significant role in affecting the amount of extractable chitosan ($P < 0.05$). Whereas for formic acid, temperature was the main determining factor for chitosan extraction ($P = 0.034$) and for hydrochloric acid, acid concentration was found to significantly affect chitosan extraction ($P < 0.01$).

Quality analyses

The degree of deacetylation for chitosan extracted from *Absidia* sp. DR grown on the

Table 1 Extraction of chitosan from 1 gram biomass using alkali at different incubation period and temperature

Inc. period (min)	Chitosan (mg)		
	95°C	115°C	121°C
10	^a 87.75 ^d	^b 117.50 ^d	^b 129.00 ^d
15	^a 90.00 ^d	^b 134.25 ^d	^b 139.25 ^d _e
20	^a 95.50 ^d	^b 136.25 ^d _e	^b 148.50 ^d _e
25	^a 102.25 ^d	^b 140.55 ^d _e	^c 159.00 ^e
30	^a 118.50 ^e	^b 145.25 ^e	^c 196.75 ^f

^{a-c} Mean values in the same row bearing different superscripts have significant statistical difference.

^{d-f} Mean values in the same column bearing different superscripts have significant statistical difference.

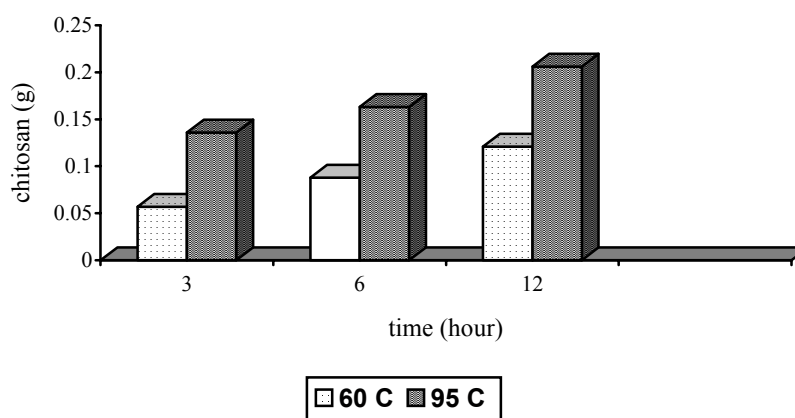


Figure 3 Extraction of chitosan using formic acid 6% at different incubation period and temperature

different media were determined. This study found that the growth medium affects the degree of deacetylation of chitosan. Fungi grown on TVB and BG produce chitosan with a higher degree of deacetylation as compared to YPG (Table 2).

This suggests that the differences in medium composition and the presence of certain elements may affect the activities of chitin deacetylase (Jaworska & Konieczna 2001). TVB contains 2000 ppm potassium ions and 300 ppm magnesium ions whereas BG contains 100 ppm potassium ions and 250 ppm magnesium ions. In addition, TVB also contains calcium ions. Microelements such as

ferum, manganese and cobalt ions are able to influence the activities of chitin synthase and chitin deacetylase (Jaworska & Konieczna 2001). Therefore the presence of potassium and calcium ions in BG and TVB were able to catalyze the activities of chitin deacetylase whereby more acetyl moieties of chitin and chitosan chain were hydrolyzed, thus increasing the degree of deacetylation of the chitosan produced. DD increased with the temperature, incubation period and acid concentration.

The degree of deacetylation (DD) for chitosan extracted by the various acid treatment were also determined (Table 3). DD increased with

Table 2 Degree of deacetylation for chitosan extracted from *Absidia* sp. DR grown on different media

Growth medium	DD
YPG	82.56%
BG	83.79%
TVB	84.55%

Table 3 Degree of deacetylation for fungal chitosan extracted using different acid treatments

Acid concentration	Incubation period	Temperature	Acetic acid	Formic acid	Hydrochloric acid
2 %	3 hours	60°C	^a 76.16% ^c	^a 76.89% ^c	^b 86.26% ^c
6 %	3 hours	60°C	^a 82.41% ^d	^a 81.72% ^d	^b 86.78% ^d
10 %	3 hours	60°C	^a 82.82% ^e	^a 83.98% ^e	^b 88.23% ^e
2 %	12 hours	95°C	^a 82.02% ^f	^a 82.56% ^f	^b 87.31% ^f
6 %	12 hours	95°C	^a 86.86% ^g	^a 84.83% ^g	^b 89.88% ^g
10 %	12 hours	95°C	^a 87.12% ^h	^a 86.15% ^h	^b 90.45% ^h

^{a-b} Mean values in the same row bearing different superscripts have significant statistical difference.

^{c-h} Mean values in the same column bearing different superscripts have significant statistical difference

Table 4 Hunter Lightness (L) values of chitosan extracted using different acid treatments

Acid concentration	Treatment	Acetic acid (L)	Formic acid (L)	Hydrochloric acid (L)
2%	3 hours 60°C	75.60	81.08	80.72
	6 hours 60°C	74.82	80.56	76.34
	12 hours 60°C	74.45	78.43	72.97
	3 hours 95°C	73.05	78.92	70.26
	6 hours 95°C	72.18	79.04	69.23
	12 hours 95°C	76.03	78.86	68.60

the increase of incubation temperature, incubation period and acid concentration. DD was also found to be significantly higher ($P < 0.01$) when hydrochloric acid was used as the extracting solution compared to acetic acid and formic acid. The highest DD (90.45%) was obtained with hydrochloric acid 10%, incubation period 12 hours and temperature 95°C meanwhile the lowest DD (76.16%) was obtained with formic acid 2%, incubation period 3 hours and temperature 60°C. Hydrochloric acid being a strong acid in comparison to acetic acid and formic acid, caused a higher degree of hydrolysis towards the acetyl moieties, in addition to hydrolysis between the monomers in the chitosan polymer.

Studies by Arcidiacono and Kaplan (1992) also showed that the type of growth medium utilized affects the average molecular weight of the chitosan extracted from fungi. According to Arcidiacono and Kaplan (1992), fungi grown on defined medium produces chitosan with significantly higher molecular weight as compared to chitosan extracted from fungi grown on complex medium. This study however found that the average molecular weight for chitosan extracted from fungi grown on complex medium was higher (2.370×10^5 Da in YPG) than chitosan extracted from fungi grown on defined (7.66×10^4 Da in TVB) and semi defined medium (6.765×10^4 in BG). The lower molecular weight conferred by fungi grown on defined medium might be due to the

presence of elements such as ferum and manganese ions or certain substrates that may cause the activities of chitin synthase to slow down (Jaworska & Konieczna 2001) or maybe even to activate the activities of chitinase enzymes. The slow down in the chitin synthase activities affects the building of chitin polymer chain, accounting for the derivation of relatively smaller chitosan polymers. The activation of chitinase on the other hand promotes the cleaving of chitin polymer chain and therefore shortening the length of the chitin polymer chain and reducing the molecular weight of the chitin and chitosan produced.

This study found that the utilization of acid as the extracting solution at low concentrations, short incubation period and low temperature gave rise to lighter-coloured chitosan (Table 4). The strength of acid also significantly affected the colour of chitosan whereby weaker acids produced lighter coloured chitosan as compared to strong acids ($P < 0.05$). Chitosan was found to have the highest lightness value ($L > 80$) when treated using formic acid 2%, incubation period 3 hours and temperature 60°C. Chitosan extracted from fungi grown on defined media was also found to have higher lightness values compared to samples extracted from fungi grown on complex medium.

4. Acknowledgement

The authors would like to thank the Ministry of Science, Technology and Innovation for the National Science Fellowship awarded to Dawn Carmel Paul and for IRPA Grant awarded to Kalaivani Nadarajah and Abdul Jalil Abdul Kader.

5. References

Andrade, V. S., Neto, B.B., Souza, W and Campos-Takaki, G.M. (2000). A factorial design analysis

of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* **46**:1042-1045.

Arcidiacono, S. and Kaplan, D.L. (1992). Molecular Weight Distribution of Chitosan Isolated from *Mucor rouxii* under Different Culture and Processing Conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **39**:281-286

Jaworska, M.M. and Konieczna, Z. (2001) The Influence of Supplemental Components In Nutrient Medium on Chitosan Formation by the Fungus *Absidia orchidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 220-224

Muzzarelli, R. A.A. & Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* **5**: 461-472.

Park, P.J., J.Y. Je, H.G. Byun, S.H. Moon & Kim, S.K. (2004). Antimicrobial activity of heterochitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**:317-323

Rege, P.R. and Block, L. H. (1999). Chitosan processing: Influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research* **321**:235-245.

Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry. London: The Macmillan Press Ltd.

Sudarshan, N.R., D.G. Hoover & D. Knorr. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology* **6**:257-272.

Tan, S.C, Teck, K.T., Sek, M.W. and Khor, E. (1996). The Chitosan Yield of Zygomycetes at their Optimum Harvesting Time. *Carbohydrate Polymers* **30**: 239-242.

White, S.A., Farina, P.R. and Fulton, I. (1979). Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**:323-328

A Partnership Between Biodiversity, Natural Product Chemistry And Biopharmaceuticals

A. Latiff, L. B. Din & I. M. Said

Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia,

Abstract

Malaysia and Indonesia are endowed with one of the richest biodiversity in the world. Efforts to conserve the rich flora and fauna have been carried out in both countries since colonial days through the establishment of National Parks, Wildlife Sanctuaries, Virgin Jungle Reserves and various kinds of Protected Areas. In Malaysia, to-day a total of 1.39 million ha (about 7.6%) of the forests of all types have been set aside for in situ conservation of biodiversity. It is hoped that these protected areas have captured most of the diverse species of plants and animals found in various ecosystems. Similarly, efforts in ex situ conservation have also been undertaken, though on a smaller scale. However, a framework for managing biodiversity in protected areas is inadequate as strategic planning and management programmes are yet to be put in place, especially for the plant diversity. Both countries are yet to define priorities for conservation and sustainable use based on ecosystem, species and genetic diversity. Measures for sustainable use in traditional agriculture, forestry, fisheries are in place but those in biodiversity prospecting, eco-tourism and impacts of urbanisation on biodiversity are yet to be established. Malaysia and Indonesia combined are represented by about 30,000 species of flowering plants, excluding that of the algae, lichens, bryophytes and pteridophytes, which are also useful in natural product chemistry and in bioprospecting for biopharmaceuticals. In the absence of concrete data of biodiversity loss in both countries it is difficult to ascertain the lists of endangered or otherwise threatened species. However, efforts to assess and monitor these have been initiated through the recently incepted Biodiversity Country Studies. Many factors have contributed to biodiversity loss; among them is the rapid socio-economic development of the country that transformed vast forested lands by logging activities, land transformation for agriculture and resettlement and subsequently creating new built-up areas such as urban and industrial areas which are relatively poor in biodiversity. Other factors such as over-harvesting and pollution have also contributed, including natural catastrophe as in Indonesia. These activities had led to significant habitat loss, degradation and fragmentation of the environment and indirectly affecting biodiversity. What are needed are frameworks and strategies for biodiversity conservation, some socio-economic strategies for sustainable use and sharing of benefits of biodiversity and also some legal measures for sustainable use and protection of biodiversity, especially for enhancing biotechnology and development of alternative medicines.

1. Introduction

The Malaysian National Policy on Biological Diversity was initiated in 1993, prepared by a special *ad hoc* committee under the auspices of the National Technical Committee on Biological Diversity. It was debated and discussed at length and subsequently launched on 16th April 1998 by the then Hon. Minister of Science, Technology and the Environment.

The National Policy is aimed to provide the direction for the country to implement strategies, action plans and programmes for conservation and sustainable utilisation of biological resources. Indonesia had earlier incepted its policy and the country studies and the documents are available for all stakeholders in that country.

Malaysia and Indonesia are two of the 12 megadiversity countries in the world. These megabiodiversity countries together contain at least 60% of the world's known species. The flora of Malaysia is exceedingly rich and is conservatively estimated to number about 15,000 species of flowering plants (Bidin & Latiff, 1995) and more than 1,170 species of ferns (Parris & Latiff, 1997). Indonesia is believed to have at least 25,000 species of flowering plants. After the completion of Tree Flora of Malays project, a total of 2,830 tree species were documented and over 26% of these tree species in Peninsular Malaysia are endemic (Ng *et al.*, 1990). Malaysia and Indonesia are undergoing tremendous socio-economic development, especially in the last 20 years or so, paving the way for future industrialisation. In the process of achieving those ends through the physical development of natural resources both terrestrial and marine, it is imperative to expect a continuous process of habitat transformation, fragmentation, conversion and destruction which have taken great and significant toll of our rich biodiversity resources. Although this concomitant loss has not been quantified, by and large the biologists, ecologists and the administrators in both countries recognised the gradual but steady loss of biodiversity as real and should be addressed before it is too late. The irony is that much of the biodiversity resources, especially those of species and genetic, have yet to be studied and documented, let alone understood, and hence would definitely impede our efforts to better utilise them sustainably for our own benefits and those of generations to come.

The diversity of biological resources provides direct economic benefits such as timber and non-timber goods in the forestry sector, food and industrial crops in the agricultural sector, and food in the fisheries sector. Certain indigenous plants, animals products and their derivatives have long been used in traditional medicine by various ethnics in Malaysia and Indonesia. Many plants, not presently used in traditional medicine, have also been found to contain biologically active compounds that are likely to be starting materials for a large number of drugs. A case in point is the recent discovery of an active compound against the HIV virus found in the bark of *Calophyllum lanigerum* and *C. teysmanii* (Guttiferae) in

Sarawak by the National Cancer Institute, United States.

On the basis of the above, there is tremendous prospect to promote the development of natural products and their derivatives as an industry in these two developing countries. The Malaysia National Policy on Biological Diversity listed, as the first of six main objectives, the optimisation of economic benefits from sustainable utilisation of components of biological diversity. Among the 15 strategies outlined for effective management of biological diversity, the following are relevant to natural products development: Improving the scientific knowledge base; enhancing sustainable utilisation of biodiversity; developing a centre excellence in industrial research in tropical biodiversity; enhancing skill, capabilities and competence, encouraging private sector participation; reviewing legislation to reflect biodiversity needs; enhancing institutional and public awareness; promoting international cooperation, and establishing funding mechanisms.

2. Plant Biodiversity

Biodiversity means the variety of ecosystems and the range of types and variability of animals, plants and microorganisms within them. It is not a fixed entity, but is constantly changing with the ecological dynamics and evolution; it is increased by new genetic variation that get incorporated into the organisms and reduced by losses, extinction of species and habitat degradation. It has become a common practice to define biodiversity in terms of ecosystem, species and genes, corresponding to three fundamental and hierarchically related levels of biological organisation. This concept emphasises the interrelatedness and the ecological function of the biological world.

Ecosystem diversity is often evaluated through measures of the diversity of the component species at a local level and then largely in terms of vegetation. It relates to the variety of habitats, biotic communities and ecological processes in the biospheres. Malaysia has at least 19 distinct natural ecosystems (Whitmore, 1975) containing up to about 7% of the world species. Indonesia being a country of large and small islands, with many volcanoes surely has many more natural ecosystems (Whitten *et al.* 1984, 1987). Species diversity could be

measured by species richness, which is the number of species in a site or habitat. For example, a total of 103 species of mosses and 370 species of flowering plants are found at Fraser's hill (Damanhuri & Nizam, 2001; Latiff et al. 2001). Discussion of species diversity is also typically presented in terms of the number of species in different taxonomic groups. For example, there are 20 species of *Rafflesia* are found in the world (Nais, 2001; Latiff & Wong 2003) or there are four species of *Johannesteijsmannia* (Palmae) are found in Peninsular Malaysia (Lim & Whitmore, 2000). These estimates include at least 12,000 species of the known flowering plants, 1159 species of ferns (Parris & Latiff, 1997), 287 species of the mammals, 158 species of amphibians and reptiles, 736 species of birds and at least 1161 species of fishes. Most of the other taxa in the Animal Kingdom are poorly known. However, our estimates that Malaysia has about 700 species of fungi, 832 species of mosses suggest corresponding patterns of species richness amongst the invertebrates. The single richest group is the insects whose estimate is not available. Lastly, genetic diversity, on the other hand, represents the heritable variation within and between populations of species.

With regards to the total number of species of living organisms present in the world is anybody's guess. Some scientists estimated the number to be in excess of 12.5 million species, with 1.7 million species identified and known to science. Most of the unknown are mainly insects and microorganisms (Wilson, 1988). As for plants a good estimate put them between 250,000 – 300,000 species. Some scientists believed the total species of living organisms will never be realised as environmental degradation will take its toll to eliminate them from various threatened habitats all over the world. They can vary by 2-20 times more (Groombridge, 1992). Biodiversity encompasses all species of plants, animals and microorganisms, and the ecosystems of which they are part. Species diversity refers to the variety of living organisms on earth, variously estimated to be between 5 to 30 millions or more, of which only about 1.4 millions have been scientifically documented (Wilson, 1988).

The flora of Malaysia is extremely rich and a conservative estimate of the seed plants has put

it about 15,000 species (Latiff, 1994; Bidin & Latiff, 1995). The flowering plants and in particular the tree species have received comprehensive studies through the Tree Flora of Malaya project and the on-going *Tree Flora of Sabah and Sarawak* Project. After the completion of the Tree Flora of Malaya, a total of more than 2830 tree species were documented and of these 746 species or 26.4% of the total are found to be endemic to Peninsular Malaysia. For Peninsular Malaysia the number of non-tree species which comprise shrubs, herbs, parasites, epiphytes, saprophytes, climbers and others may be more than that of trees, but their taxonomy and diversity remain uncertain because there is no similar effort to study their taxonomy, distribution and endemism like that of tree species. After the publication of the two installments of the Tree Flora of Sabah and Sarawak which covers 56 small and medium families, it has become apparent that species diversity and endemism are higher.

The plant biodiversity resources in Indonesia is far from being known as the area is so vast and the scientific capacity is not adequate. Only the Flora of Java is in place, that of Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Irian Jaya and other smaller islands are not known. It is hoped that with the completion of Flora Malesiana, a project undertaken by Rijksherbarium, Leiden and Herbarium Bogoriense, some of the pertinent questions with regards to the rich and diverse Indonesia flora will be known for sustainable use. On the other hand, Indonesia also suffers great loss of its ecosystems and species to natural disaster and catastrophe as evidenced by the past earthquakes and volcanic eruptions that had occurred.

3. Phytochemical Screening

It is always argued by some scientists that the preliminary phytochemical screening of plants would give clues to the subsequent quests for chemical compounds that could be the basis for pharmaceutical products. While there are some truths in this as given by the past discoveries of quinine and other drugs, there also exist some quicker but more expensive approaches, such as the thorough-put screening as practiced by large laboratories in the United States and Australia. In Malaysia the history of phytochemical screening of plants dated back to Arthur (1954), who screened some plants

from Sabah (then named North Borneo). However, the involvement of the ethnobotanists and phytochemists at the Universiti Kebangsaan Malaysia could be traced only to 1985. Since then there have been a constant flow of activities, from carrying out field works and scientific expeditions to collect plants and screen the plant tissues for the presence of certain secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, flavonones, triterpenes, saponins and others. The phytochemical screening could be general in objectives such as those carried out by Said et al. (1990, 1992b, 2000), Latiff et al. (1995), Nik Idris et al. (2001a, 2001b), Din et al. (2001), Nik Idris et al. (2002), Wan Yaacob et al. (2000) to cite a few or on specific plant family such as Menispermaceae (Latiff, 1985). Subsequently, all these activities were summarized by Latiff and Said (1989).

These preliminary screenings had paved ways for the ultimate natural product chemistry research by the chemists that have been undertaken as discussed below. The phytochemical surveys gave leads to the chemists as to what taxa they should embarked to do a comprehensive and extensive studies. Normally after the preliminary screenings, bulk collection of plants were made to isolate the chemical compounds and these compounds are later subjected to biological screenings and toxicity studies before they could be candidates for pharmacological works.

4. Natural Product Chemistry

Biodiversity could play an important role in pharmaceutical industries, especially in the quest for new medicines or new derivatives (Farnsworth, 1988; Salleh *et al.*, 1995). Farnsworth (1988), in particular really believed that plants are answers to new medicines. It is already known that, medicinal plants have great economic significance in both countries if the pursue for new medicines were to be carried out in systematic manner. (Latiff, 1983; Kumari et al., 1998). In the past ethnobiology and ethnopharmacology have contributed a great deal in the search for new medicines and they are still important (Ismali et al., 1995; Mat-Salleh & Latiff, 2002). Lately, the use of combinatorial chemistry and the thorough-put screenings for new natural products have sped up the process of discovery of drugs from nature. However, this approach is rather

expensive, and both countries such as Malaysia and Indonesia could not afford the infrastructures.

Quest for new medicines and other products

By and large there have been debates in many tropical countries with rich biodiversity that the potential of bioprospecting from biodiversity may give rise to new biotechnology (Svarstad & Dhillon, 2000). On one hand, this may be true as these countries are custodians of the rich reservoir of new medicines. But on the other hand, most of these countries do not have the financial means to undertake such a capital-intensive ventures. Furthermore, these countries also lack the technology and human resources. The following statements are testimony to the above.

It is estimated that more than 25% of new medicines that are in the markets are derived from natural products, especially plants. Estimate of their worth is debatable, but a figure of more than US\$60-180 billion each year is possible. Two issues are related, namely Biotrade and life patenting. Some examples are hereby cited.

The discovery of vinblastine and vincristines from Madagascan rosy periwinkle (*Catharanthus roseus*) for the treatment of pediatric leukemia and Hodgkin's disease led to a small controversies. Some people felt that some reciprocal benefits and compensation should be accrued to Madagascar as they thought the plant species is only found in that island republic. In fact the species is found in many other tropical countries from Madagascar to the Pacific. Similar controversy occurs with Pacific yew which is used for the treatment of ovarian cancer. In India, the neem tree (*Azadirachta indica*) which for centuries has been used as natural insecticides had been patented by certain pharmaceutical company in the United States. At home, the recently discovered chemicals from *Bintangor* plants in Sarawak (*Calophyllum lanigerum* and *C. teysmanii*) which showed some potentials as anti HIV compounds is beginning to take the attention of not only the scientists by also the law makers, especially in Sarawak (Lajis & Kiew, 1995). The examples above were cited to illustrate some controversies resulted from contentions with regards to Intellectual Property Rights without reciprocal benefits and

compensation for the donours of the natural resources.

In ASEAN countries in the last few years some progress have been achieved in addressing some of the important natural products research issues. Among them is the legislation for access of natural resources including proclamation of the Melaka Accord. This document is still under scrutiny by the Attorney Generals Office of Malaysia. However, all ASEAN member countries have discussed this issue and a joint communiqué is awaited, especially with regards to cooperative research with ASEAN and non-ASEAN institutions.

At the same time many research undertakings have been carried out by various universities and research institutes with foreign counterparts, either as a joint venture, joint-programmes or cooperations.

Progress in Natural Products Research

In the last decade there have been some important progress in the natural product chemistry research, especially on indigenous plant species. The authors would attempt to highlight some of the significant discoveries by researchers at the Universiti Kebangsaan Malaysia. Other researchers, notably from Universiti Putra Malaysia, Universiti Malaya, Universiti Sains Malaysia, Forestry Research Institute Malaysia have also contributed to natural product studies.

Din et al. (1989, 1990) had studied laurolitine from *Actinodaphne pruinosa* (Lauraceae) and *Diospyros* species (Ebenaceae). Similarly, Said et al. (1991) had studied the alkaloids of another Lauraceae, *Dehassia incrassata*. This approach is similar to those taken by our Indonesian counterparts at Institut Teknologi Bandung (e.g. Hakim and Achmad, 1991, Achmad et al., 1992; Hakim et al. (1993) on Lauraceae. In fact, progress on the natural product chemistry of Lauraceae has been very encouraging in their quests for novel natural compounds. Members of the family Lauraceae are among the commonest in our tropical forests. In particular, cinnamomun is one of the well-exploited spices. The taxonomy of this complex and difficult family at species level has impeded our progress in the chemistry of this interesting family.

In the Annonaceae, another common family in the lowland dipterocarp forests of Malaysia and

Indonesia, similar progress had been made. Members of Annonaceae are well-known to contains many interesting chemical compounds such as alkaloids, terpenes and flavonoids. Din et al. (1992, 1993, 1997), Colegate et al. (1990; 1992) have studies some interesting compounds from some members of the Annonaceae, particularly on the genera *Goniothalamus*, *Desmos*, *Alphonsea*, and *Polyalthia*. These genera featured very strongly in tradistional medicine (Mat-Salleh & Latiff, 2002). One interesting discovery is the isolation of goniothalamine and its derivatives from some species of *Goniothalamus*, including *G. umbrosus*, *G. scortechnii*, *G. macrophyllus* that hold promises as anti-cancer, anti-inflamation properties and others.

In other plant families, Houghton et al. (1991) had studied the alkaloids from *Mitragyna speciosa*, a species that is known locally as *biak-biak*, and of late decoction of the leaves had been taken orally for drug substitute. Said et al. (1989, 1991, 1992a) had also studied the alkaloids from *Tabernaemontana capsicoides*, *Dehassia incrassata* and *Alstonia angustifolia*, respectively. Similarly, these species have been widely used by Malays in their traditional medicine (Mat-Salleh & Latiff, 2002). Some progress in lichen chemistry have also been made (Din et al. 2002)

5. Biopharmaceutical Industry

It is a common knowledge that biodiversity resources have important economic, social and technological implications. Among them is the economic benefits and food security that could be derived from them; biodiversity also stabilises the environment through ecological functioning and many plant and animal species form the biological heritage of a country. In Malaysia, agriculture, forestry and fisheries sectors have contributed about 13.6% of the national gross domestic product in 1995 and accounted for about 12.1% of the total export earnings. In 1994 tourism alone contributed about RM 8.3 billion to the national economy and much of tourism industry relies on the diverse and unspoiled natural beauty of the country's landscapes, including the unique species of plants and animals residing in national parks, wildlife reserves and marine parks. The value of biodiversity to science and education does not require any further elucidation.

Malaysia and Indonesia ratified the Convention on Biological Diversity in 1994 which set the platform of commitments under the treaty and reaffirms the sovereign rights of States over their biodiversity and the responsibility to conserve and utilise the resources in a sustainable manner. As Malaysia and Indonesia are already a party to the Convention of International Trade in Endangered species of wild fauna and flora (CITES) and also a member of the International Union of Conservation of Nature and Natural resources (IUCN), as well other international networks, the responsibility is even more pronounced to conserve our biodiversity and to use them for sustainable development. Subsequently Malaysia and Indonesia ratified the United Nations Framework on Climate Change and RAMSAR Convention on Wetlands of International importance especially as waterfowl habitats which set its commitment to monitor and carry out research on the impact of climate change and wetland utilisation on biodiversity, in particular the birds.

Of late a new partnership between biodiversity, biotechnology and pharmacy surfaced through some international initiatives called bioprospecting. With the rapid development of modern technology in the developed countries, especially combinatorial chemistry, the interest in traditional medicine and nature as a source of new pharmaceuticals was enhanced. The old scenario where chemists relied on ethnobiological information has changed dramatically. To-day many huge programmes for natural compound screening are under-way; these have been initiated by international organisations, scientific institutions and giant transnational pharmaceutical companies. Only through an equitable partnership between parties that biodiversity could be utilised in a sustainable manner for generations to come. One well-known example is the initiatives taken by National Cancer Institute that sent their chemists and botanists to most ASEAN countries to screen plants for anti-cancer properties. As a spin-off, they made a discovery that some chemical compounds isolated from species of *Calophyllum* of Sarawak, have positive reactions against HIV.

Research in natural product chemistry should take note of the vast resources that are available in both countries (Latiff et al. 1984)) and also

the resources that are available *ex situ*. In the past it is apparent that the supply of plants or animals could come from the natural habitats. Realising that more and more natural habitats are being degraded by both human interferences and natural disaster, one must turn one's attention to the supply from the *ex situ* infrastructures such as estates. Institutions such as botanical gardens, zoos and arboreta as well as private collections could also play their part in some studies. The case of point is the fate of *Tongkat Ali* (*Eurycoma longifolia*) which has been over-exploited by many small- and medium industries for making crude medicine. This species had been claimed to have aphrodisiac properties hence the demand by men, in particular had been tremendous. While the turn-over has been very excellent, the supply of roots and stems of this plant has been not forthcoming from the natural habitats. One easily could suggest that planting of this material must be carried out, but this requires extensive studies on its agronomy and soil-suitability as well as its variation of chemical contents.

6. Acknowledgements

The authors are grateful to the organisers of the seminar, in particular Assoc. Prof. Yang Farina Abdul Aziz and her Organising Committee for the invitation to present this paper and in particular Dr. Ishak Ahmad and Pn. Kiftiah Abdul Razak for making the presentation possible.

7. References

- Achmad, S. A., E. L. Ghisalberti, E. H. Hakim, L. Makmur & M. Manurung. 1992. A new sesquiterpene alcohol from *Litsea amara* Blume (Lauraceae). *Phytochemistry* 31(6) : 2153
- Arthur, H. R. 1954. A phytochemical survey of some plants of North Borneo. *J. Pharm. and Pharmacol.* 6 : 66-71
- Bidin, A. A. & A. Latiff. 1995. The status of terrestrial biodiversity in Malaysia. In : A. H. Zakri (Ed.). *Prospects in biodiversity prospecting*. Genetic Society of Malaysia & Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 59-76
- Colegate, S. M., Laily B Din, A. Latiff, K. Mat Salleh, M. W. Samsudin, B. W Skelton, K. Tadano, A. H White & Z. Zakaria. 1990. (+) - Isoalthalactone : A Furanopyrone isolated from

- some *Goniiothalamus* species. *Phytochemistry*. 29 (5) : 1701-1704
- Colegate, S. M., L. B. Din, E. Ghisalberti & A. Latiff. 1992. Tepanone : An unusual chalcone isolated from *Ellipeia cuneifolia* (Annonaceae). *Phytochemistry* 31(6) : 2123-2126
- Damanhuri, A. & M. S. Nizam. 2001. Mosses of Fraser's hill. In : A. Latiff et al. (Eds.). *Bukit Fraser : Persekitaran Fizikal, Biologi dan Sosio-ekonomi*. pp. 207-224. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Din, L. B., A. H. A. Hadi & A. Latiff. 1989. Lauroilsine, an aporphine alkaloid from *Actinodaphne pruinosa* Nees (Lauraceae). *Buletin Kimia* 4(2) : 72-76
- Din, L. B., Z. Zakaria, M. W. Samsudin, A. Latiff & S. M. Colegate. 1990. Naftakuinon daripada buah muda *Diospyros wallichii* dan *D. latisejala* (Ebenaceae). *Sains Malaysiana* 19 (2) : 33-36
- Din, L. B., N. I. Yusoff, I. M. Said & A. Latiff. 1992. Alkaloids from *Alphonsea curtisii* (Annonaceae). *Sains Malaysiana* 21(2) : 73-75
- Din, L.B., Z. Zakaria, M.W. Samsudin, Ikram M. Said & A. Latiff. 1993. Dibenzoylmethane from *Desmos cochinchinesis* and *D. chinensis* (Annonaceae). *Sains Malaysiana* 22(2) : 55-57
- Din, L. B., R. O. Ali & A. Latiff. 1997. Isolation of a benzylisoquinoline from *Alphonsea boniana* (Annonaceae). *Malays. J. Anal. Sci.* 3(1) : 1-3
- Din, L. B., N. I. Yusoff, M. W. Samsudin, U. Suki, K. Mat-Salleh, A. Z. Ibrahim, A. Latiff & I. M. Said. 2001. Preliminary phytochemical survey of plants in Crocker Range National Park, Sabah, Malaysia. In: G Ismail & Lamry Ali (Eds.). *A Scientific Journey through Borneo: The Crocker Range National Park, Sabah*. Vol. 1 : 105-112. ASEAN Academic Press.
- Din, L. B., Z. Zakaria, A. Latiff & J. A. Elix. 2002. Chemical constituents of the lichen, *Heterodermia labellate* and *H. leucomelos* (Physciaceae) in Peninsular Malaysia. *Mal. Nat. J.* 56(1) : 1-3
- Farnsworth, N. R. 1988. Screening plants for new medicine. In : Wilson, E. O. (Ed.). *Biodiversity*. Washington DC, National Academy Press
- Groombridge, B. (Ed.). 1992. *Global Biodiversity - Status of the Earth's Living Resources*. World Conservation Monitoring Centre. London: Chapman & Hall.
- Hakim, E. H. & S. A. Achmad. 1991. Isolation of actinodaphnine from *Litsea diversifolia*. *ACJC Chem Res. Comm.* 1(1) : 3
- Hakim, E. H., S. A. Achmad, Effendy, E. L. Ghisalberti, D. C. R. Hockless & A. H. White. 1993. Structural studies of three sesquiterpenes from *Litsea* spp. (Lauraceae). *Aust. J. Chem.* 46 : 1355
- Houghton, P. J., A. Latiff & I. M. Said. 1991. Alkaloids from *Mitragyna speciosa*. *Phytochemistry* 30 : 347-350
- Ismail, G., M. Mohamed & L. B. Din (Eds.). 1995. *Chemical Prospecting in the Malaysian Forest*. Pelanduk Publications.
- Ismail, G. (Ed.). 1997. *Bioresource Utilisation – The Biotechnology Option for Malaysia*. Pelanduk Publications.
- Kumari, K., Y M Dan & Tuan Marina Tuan Ibrahim. 1998. *Economic significance of medicinal plants in Peninsular Malaysia*. Forestry Department Peninsular Malaysia.
- Lajis, N. H. & R. Kiew. 1995. Global cooperation in biodiversity prospecting and conservation. In : A. H. Zakri (Ed.). *Prospects in biodiversity prospecting*. Genetic Society of Malaysia & Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 267-280
- Latiff, A. 1983. Aspek ekologi dan botani dalam kajian tumbuhan ubatan. In: Marziah, M. (ed.). *Proceedings of the Seminar on Scientific Approach to traditional medicine*, Serdang. Pp. 38-44.
- Latiff, A., G. Ismail, M. Omar, M. I. Said & A. Kadri. 1984. A multivariate approach to the study of medicinal plants in Malaysia. *Sing. Natl. Acad. Sci.* 13: 101-113
- Latiff, A. 1985. Ethnobotanical and Phytochemical studies on Malaysian Menispermaceae. *Malays. Appl. Biol.* 14(2): 68-75
- Latiff, A. 1985. Some Malaysian plants of medicinal value. In: Nordin Hj. Lajis et al. (eds.). *The phytochemical survey*. Universiti Pertanian Malaysia. Pp. 12-19
- Latiff, A. 1986. Medicinal plants and natural products research - An empirical perspective. In: Ikram M. Said & Z. Zakaria (eds.). *Prosiding Perjumpaan Kumpulan Penyelidik Sebatian semulajadi ke-2*. Pp. 54-67
- Latiff, A. & I. M. Said. 1989. Phytochemistry in perspectives : Chemical screening of Malaysian plants of medicinal interests. In : I. M. Said & L. B. Din (Eds.). *Systematic identification of natural products*. Universiti Kebangsaan Malaysia. pp. 97-111
- Latiff, A. 1989. Some noteworthy botanical aspects of Malaysian medicinal plants. In: E. Soepadmo et al. (Eds.). *Malaysian Traditional Medicine*. Pp. 1-7. Institute of Advanced Studies, Universiti Malaya.
- Latiff, A., S. Z. Tumiri and A. D. H. Mohamad. 1989. The effect of some extracts of moss species

- on three species of bacteria. *Malays. Appl. Biol.* 18(1) : 97-106
- Latiff, A. & Ikram M Said. 1989. Phytochemistry in Perspectives : Chemical Screening of Malaysian plants of medicinal interests. In : I. M. Said & L. B. Din (Eds.). *Systematic Identification of Natural Products*. Pp. 97-111, Department of Chemistry, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.
- Latiff, A. 1989. Genetic resources of medicinal plants in Malaysia. In : A. H. Zakri (Ed.) *Genetic Resources of under-utilised plants in Malaysia*. Pp. 49-63.
- Latiff, A. 1992. Plant resources for natural products : An ethnobotanical survey. In: Khozirah Shaari et al. (Eds.). *Medicinal products from tropical rain forests*. Pp. 1-12. FRIM, Kuala Lumpur.
- Latiff, A. 1994. *Kepelbagaian Tumbuhan - Status sumber alam Malaysia*. Universiti Kebangsaan Malaysia Press, 42 pp.
- Latiff, A. & I. M. Said. 1994. Legislative framework in conservation of biodiversity and exploitation of organisms for natural products. In : I. M. Said, Z. Zakaria & H. H. Hamzah (Eds.). *Bioassay Guided Isolation of Natural Products*. Universiti Kebangsaan Malaysia. pp. 1-12
- Latiff, A. & M. I. Said. 1994. Legislative framework in conservation of biological diversity and exploitation of organisms for natural products. In I. M. Said et al. (Eds.). *Bioassay guided isolation of natural products*. Pp. 1-12, Department of Chemistry, Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Latiff, A., A. Zainudin Ibrahim, G. H. Petol, Ujang Suki, R. Mohamad, N. M. Al-Schwedi & M. I. Said. 1995. Phytochemical and toxicity screening of plants from Fraser Hill, Pahang, Malaysia. In : G. Ismail et al. (Eds.). *Chemical prospecting in Malaysian forest* Pp. 27-42. Universiti Malaysia Sarawak. Pelanduk Publications.
- Latiff, A. 1998. Conservation and utilisation of botanical diversity in Malaysia. *Malaysian Applied Biology* 27 (1& 2) : 1-11
- Latiff, A., S. Khamis, M. Nazre, I. Faidah-Hanum, A. Z. Ibrahim & K. Mat-Salleh. 2001. An annotated checklist of seed plants of Fraser's hill. In : A. Latiff et al. (Eds.). *Bukit Fraser : Persekitaran Fizikal, Biologi dan Sosio-ekonomi*. pp. 245-275. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Latiff, A. 2003. Traditional use, potential for exploitation and conservation of medicinal plants in Malaysia. *Sarawak Development Journal* 6 (2) : 21-38
- Latiff, A. & M. Wong. 2003. A new species of *Rafflesia* from Peninsular Malaysia. *Folia malaysiana* 4 (3 & 4) : 135-146
- Lim, C. K. & T. C. Whitmore. 2000. The magnificent *Johannesteijsmannia* palms of Malaysia. *Folia malaysiana* 2 : 13-26
- Mat-Salleh, K. & A. Latiff. 2002. (Eds.). *Tumbuhan Ubatan Malaysia*. Pusat Pengurusan Penyelidikan, Universiti Kebangsaan Malaysia. 797 pp
- McNeely, J. A., K. R. Miller, W. V. Reid, R. A. Mittermeier & T. B. Werner. 1991. *Conserving the World's biological diversity*. WRI, IUCN, World Bank, WWF, Conservation International, Washington D.C. and Gland, Switzerland
- Mugabe, J., C. V. Barber, G. Henne, L. Glowka & A. La Vina (Eds.). 1997. *Access to Genetic Resources*. ACTS Press, Nairobi.
- Nais, J. 2001. *Rafflesia of the World*. Sabah Parks, Kota Kinabalu, Sabah.
- Ng, F.S.P., C. M. Low & Mat Asri Ngah Sanan. 1990. Endemic trees of the Malay Peninsula. *FRIM Research Pamphlets*. 118 pp.
- Nijar, G. S. 1995. Developing a "right regime" for control of biodiversity and indigenous knowledge. In : A. H. Zakri (Ed.). *Prospects in biodiversity prospecting*. Genetic Society of Malaysia & Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 225-265
- Nik Idris Yusoff, Siti Zaiton Mat So'ad, Ujang Suki, A. Z. Ibrahim, A. Latiff & Ikram M Said. 2001. Phytochemical screening of Ayer Hitam Forest Reserve : Isolation of Ariskanin-A from *Thottea corymbosa* (Griff.) Ding Hou (Aristolochiaceae). *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 24 (1) : 49-52
- Nik Idris, N. Y., U. Suki, B. Din, A. Zainudin Ibrahim, K. Mat-Salleh & A. Latiff. 2001. A preliminary phytochemical and biological screening of plants from Taman Negeri Perlis, Wang Kelian, Perlis. In: Faridah-Hanum, I., Kassim Othman & A. Latiff (Eds.). *Kepelbagaian Biologi dan Pengurusan Taman Negeri Perlis: Persekitaran Fizikal dan Biologi Wang Kelian*. 285-292. Jabatan Hutan Negeri Perlis.
- Nik Idris Yusoff, Ikram M Said, Laily b Din, Ujang Suki, Bakri Din, A. Zainudin Ibrahim, K. Mat-Salleh & A. Latiff. 2002. Phytochemical and biological screening of plants from Hutan Simpan Wang Mu, Taman Negeri Perlis. In : Latiff, Kasim Osman, Yusoff A Rahaman & I. Faridah-Hanum (Eds.). *Biodiversity and Management of Perlis State Park - Physical, biological and Social environment of Wang Mu*. Pp. 303-308. Department of Forestry, Perlis.
- Primack, R. B. and T. H. Kunz. 1996. The biodiversity crisis and conservation biology. In : Zainal Abidin Abu Hasan & Zubaid Akhbar (Eds.). *Conservation and faunal biodiversity in Malaysia*. Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 11-23

- Reid, W. V. & K. R. Miller. 1988. Keeping options alive : *The scientific basis for conserving biodiversity*. World Resource Institute, Washington D.C.
- Parris, B.S. & A. Latiff. 1997. Towards a pteridophyte flora of Malaysia : A provisional checklist of taxa. *Mal. Nat. J.* 50 (4) : 12-45
- Said, I. M., C. H. Lim & A. Latiff. 1989. Kajian alkaloid daripada daun segar *Tabernaemontana capsicoides*. *Sains Malaysiana* 18 (2) : 19-23
- Said, I. M., L. B. Din, M. W. Samsudin, Z. Zakaria, N. I. N. Yusoff, U. Suki, A. Manap, Z. Ibrahim & A. Latiff. 1990. A phytochemical survey of Ulu Kinchin, Pahang, Malaysia. *Mal. Nat. J.* 43(4) : 260-266
- Said, I. M., A. Latiff, S. J. Patridge & J. D. Phillipson. 1991. Alkaloids from *Dehassia incrassata*. *Planta Medica* 57 : 389
- Said, I. M., L. B. Din, N. I. Yusoff. 1992a. A new alkaloid from the root of *Alstonia angustifolia*. *J. Nat. Prod.* 55 (9) : 1323-1324
- Said, I. M., A. Latiff, S. Omar & W. Y. W. Ahmad. 1992b. Phytochemical studies of Bornean flora. In : Ghazally Ismail et al. (Eds.). *Forest Biology and Conservation in Borneo. Centre for Borneo Studies Publication No. 2* : 542-544
- Said, I. M., U. Suki, L. B. Din, N. I. Yusoff, M. W. Samsudin, Z. Zakaria, A. Z. Ibrahim & A. Latiff. 2000. Preliminary phytochemical and biological screening of plants from Belum Forest Reserve, Hulu Perak, Malaysia. *Mal. Nat. J.* 54(3) : 187-193
- Salleh, M. N., A. A. Kadir, K. Shaari & I. Jantan. 1995. Medicinal products from the tropical rainforests of the Far East. In : A. H. Zakri (Ed.). *Prospects in biodiversity prospecting*. Genetic Society of Malaysia & Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 95-105
- Sam, T. C., S. Y. Chew, Sabirin Matsjeh, E. K. Gan, Dzulkifli Razak & A. Latiff. 1987. Goniothalamine oxide: an embryotoxic compound from *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae). *Tetrahedron Letters* 28(22): 2541-2544
- Svarstad, H. & S. S. Dhillon (Eds.). 2000. *Responding to bioprospecting from biodiversity in the South to medicine in the North*. Oslo. Wan-Yaacob, A., S. W. Tong, Laily b Din, Nik Idris Yusoff, A. Latiff & K. Mat Salleh. 2000. An alkaloid phytochemical survey of plants of Gunung Danum area, Sabah. *Malayan Nature Journal* 54 (2) : 87-94
- Whitmore, T. C. 1975. *Tropical rainforest of the Far East*. Clarendon Press, Oxford.
- Whitten, A. J., S. J. Damanik, J. Anwar & N. Hisyam. 1984. *The Ecology of Sumatra*. Gadjah Mada University Press.
- Whitten, A. J., M. Mustafā & G. S. Henderson. 1987. *The Ecology of Sulawesi*. Gadjah Mada University Press.
- Wilson, E. O. 1988. The current state of biological diversity. In : E. O. Wilson & M. P. Francis (Ed.). *Biodiversity*. National Academy Press. Pp. 3-18
- Zakri, A. H. 1986. Status of conservation and utilisation of crop genetic resources in Malaysia. *Malays. Appl. Biol.* 15 : 169-178
- Zakri, A. H. (Ed.). 1995. *Prospects in Biodiversity Prospecting*. Genetics Society of Malaysia & Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Zakri, A. H. & A. Latiff 1991. Preserving genetic diversity : Exotic strains and native plants. In : A. H. Zakri et al. (Eds.). *Conservation of plant genetic resources through in vitro methods*. FRIM & MNCGPR, Kuala Lumpur. Pp. 171-180
- Zakaria, Z., L. B. Din, A. Latiff & J. A. Elix. 2000. Notes on the morphology and chemical constituents of the lichen, *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. in Peninsular Malaysia. *Mal. Nat. J.* 54(1) : 27-30
- Zakaria, Z., Laily b Din, Nik Idris Yusoff, Mohd. Wahid Samsudin, Ujang Suki, K. Mat-Salleh, A. Zainudin Ibrahim, A. Latiff & Ikram M Said. 2001. A preliminary phytochemical survey of plants in Fraser's hill. In : Latiff, A., Zuriati Zakaria, Zaidi M I, K. Mat-Salleh, Noorazuan Md. Hashim & Laily b Din (Eds.) *Bukit Fraser – Persekitaran Fizikal, Biologi dan Sosio-ekonomi*. Universiti Kebangsaan Malaysia. Pp. 321-330



Preparation and Characterization of High Surface Area MgO and The Stability Study of Cypermethrin

Abdul Rahim Yacob ¹⁾ and Hanis bt Mohd Yusoff ²⁾

Chemistry Department / Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Skudai, Johor, Malaysia.

Email: manrahim@kimia.fs.utm.my

Chemistry Department / Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Skudai, Johor, Malaysia.

Email: hanismy07@yahoo.com

Abstract:

MgO has the ability to act as a catalyst once with high surface area morphology. MgO have simple rock salt structure with surface morphology of 2D shows predominantly (100) type crystal face and a small number of morphology defects. In this study, various methods have been used to prepare the high surface area MgO and include, modified dehydration, open calcinations and autoclave preparation of MgO aerogel. The samples were characterize by spectroscopic techniques include Fourier Transform Infra-Red (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and electron Spin resonance (ESR). For better understanding or the MgO morphology and high surface area, Scanning Electron Microscope (SEM) and BET Surface Area were used. Through NMR and ESR results it showed that there are 3 types of coordination on MgO(100) surface. While BET analysis has showed that there is an optimum point for sample heating, which is at 600^oC and the range of the surface area is 200-230 m²/g. An intriguing fact about cypermethrin, it is a pesticide which is not harmful to human. Thus its stability towards this high surface area alkaline earth oxide has opened a new dimension of study in fundamental science and technology.

Keywords: MgO, Cypermethrin

1. Introduction

Magnesium is also known as alkaline earth metal. The main minerals in which magnesium is found are carnellite, magnesite and dolomite. Magnesium is the eight most abundance element in earth's crust. Magnesium oxides are used in a variety of technological applications, for example they are used both in pure form and mixed with other oxides as precursors materials [1]. According to Erich Knozinger *et al.* (1993), magnesium oxide, MgO is an excellent model compound for the study of adsorption phenomena. It is also exhibits a simple rock salt structure with minimal surface defect. MgO possess mostly basic surface sites and may easily be produced as high surface area material [1, 2]. MgO crystals can be

prepared in vastly different surface areas, crystals sizes and shapes, since MgO is highly ionic, it seems unlikely that these crystal shapes would change when molecules are adsorbed on their surfaces [3].

One of the oldest insecticide known is pyrethrum. Pyrethrin insecticide is derived from pyrethrum flowers. Products from the flowers contain poison that can attack the nerve system of the insects. The beautiful thing about this insecticide is that it's not harmful to human. Synthetic pyrethroid was developed because of their great effectiveness and safety of application. Cypermethrin is one of the fourth generations of synthetic pyrethroid. It is extremely effective against a wide range of insect and it is widely used in agriculture [4].

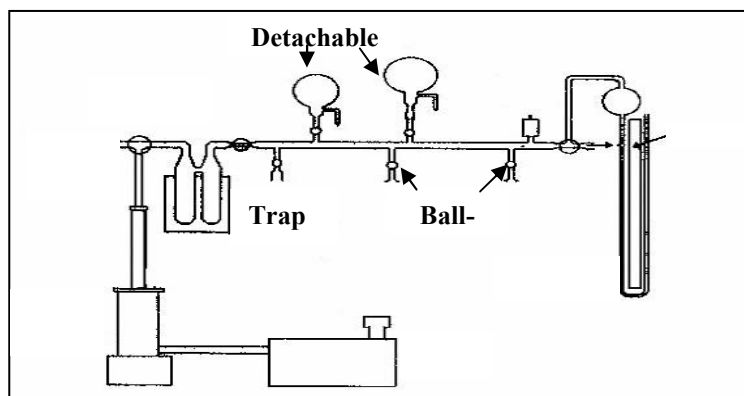


Figure 2.1 Rotary pump system

2. Experimental

In this study three methods have been prepared. The first method is by converting the commercial MgO (Goodrich Chemical), to their respective hydroxides also known as modified dehydration technique. Commercial MgO was placed inside the beaker with distilled water. The solution was heated for 16 hours. Mg(OH)₂ was formed through this reaction. Next is the activation process where the samples (0.05-0.01g) were heated in high vacuum pump system of less than 10⁻⁵ mbar. Heating process was at various temperature starts with 200°C, 400°C, 600°C and 800°C. These samples were labeled as D-MgO.

The second method, labeled as DC-MgO is by calcining the samples from the first method at various temperature 200°C, 400°C, 600°C and 800°C. The third method is autoclave preparation [5]. Mg turnings (2.4g) were stirred with methanol (100ml). Later the milky solution was added drop by drop to toluene (200ml) and was stirred for 24 hours. Both processes using round bottom flask and argon gas was flowed in along the process. Gel-like solution was formed known as MgO aerogel and labeled as SG-MgO. The gel was dried using autoclave at 121°C. After this process white powder was formed. These powders was heated again using high vacuum pump system at 200°C, 400°C, 600°C and 800°C. Samples were characterized using FTIR, NMR, ESR and SEM.

To study the stability of cypermethrin, commercial MgO have been used as the matrix. Two sets of samples were prepared which is blank and cypermethrin containing commercial MgO with the ratio of MgO to cypermethrin, 1:20. the samples was placed inside the incubator

at the temperature of 54 °C for two weeks. The samples were analysed using FTIR and UV-visible spectrometer.

3. Results and Discussion

3.1 Fourier Transform Infra Red (FTIR)

The FTIR spectrum (Figure 2), showed two prominent peaks 3450.4cm⁻¹ and 3697.3cm⁻¹. These two peaks showed that the probability of two -OH stretching. These stretching represent two types of -OH bonds. The -OH stretching at 3697.3cm⁻¹ was identified as the unassociated -OH bonds and it is a surface water molecules [6]. While -OH stretching at 3450.4cm⁻¹ was shifted to the right because it is the -H bond of inter-molecule [7].

3.2 Nucleus Magnetic Resonance (NMR)

Figure 3 showed that there was three sites (A, B and C) that proton preferred to go. As the temperature increase the peak ratio become different. From the spectrums peak C is more shielded than A and B, so C represent the proton nucleus at the 5-coordination. While A and B represent 3-coordination and 4-coordination. Since B is at the side of the lattice, H₂O molecule will be easily eliminated at a great degree [8-10].

3.3 Electron Spin Resonance (ESR)

ESR has been used to investigate a variety of trapped electron centers on the surface materials. Activated oxide at 800°C from the first method was used for this experiment. H₂ was introduced into the sample and UV-irradiated in-situ. The rate growth of the ESR peaks was recorded with respect to time. From equation, rate growth of the peaks follows the first rule order. According to Figure 3.3 (a), there was no peak before UV-irradiation. After 20 minutes of UV-irradiation Figure 3.3 (b), the

peak grows higher. From this result, the liability is ESR is in agreement with NMR. Comparison of both result showed that in NMR

one peak intent to grow more than the other two peaks while ESR showed at two minutes of UV-irradiation two peaks appeared but after

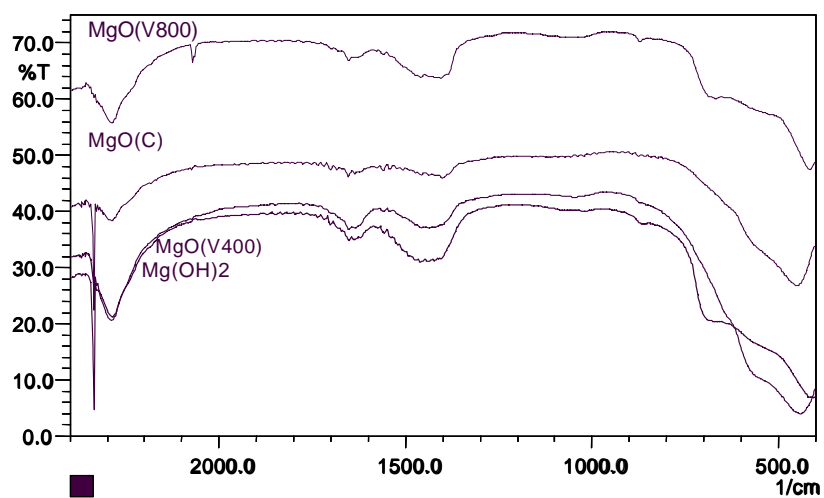


Figure 3.1 FTIR spectra of MgO before and after activation

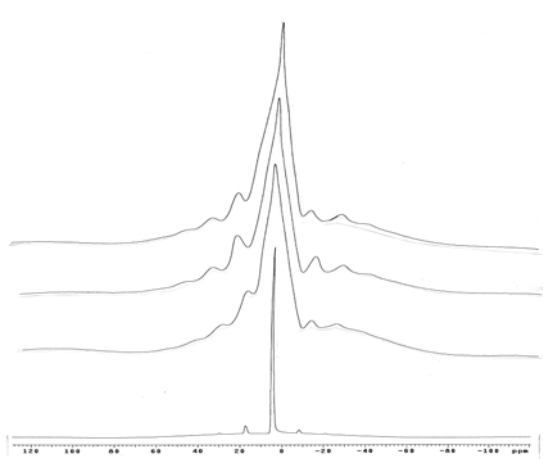
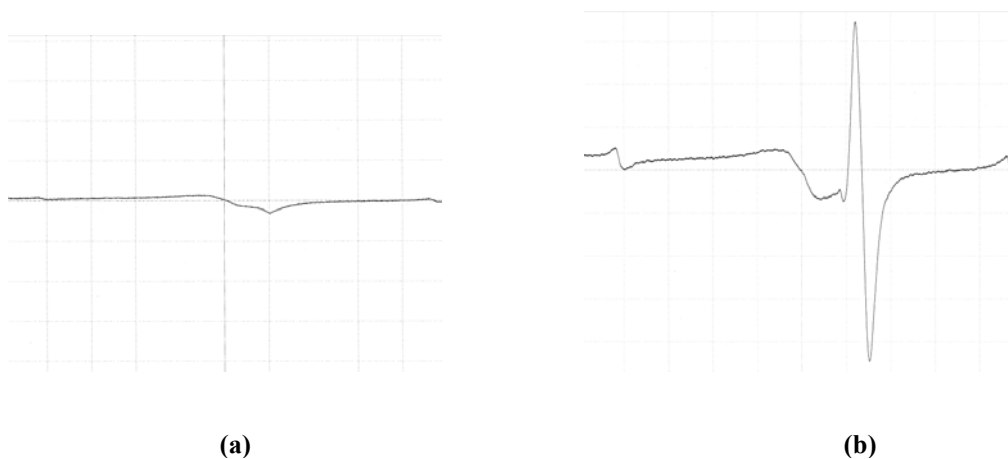


Figure 3.2 NMR spectra of MgO before and after activation



(a)

(b)

Figure 3.3 a and b

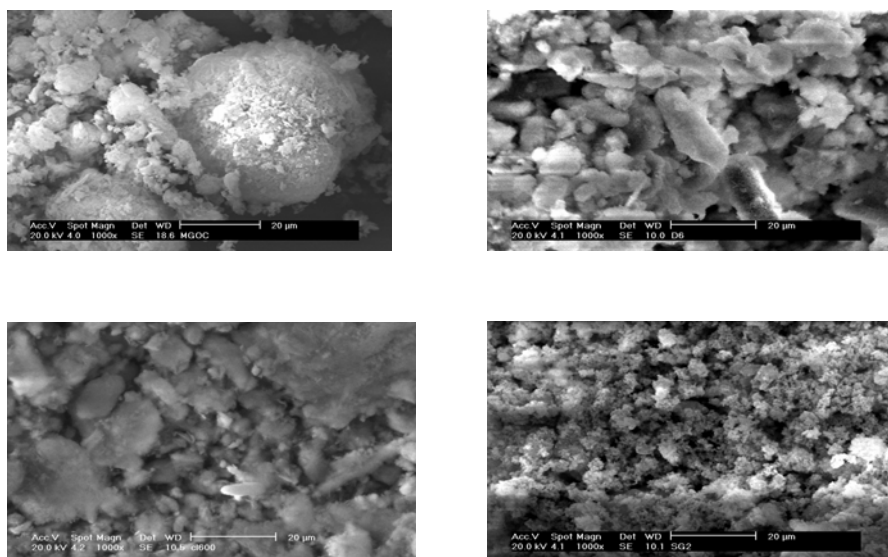


Figure 3.4 a, b, c and d (clockwise)

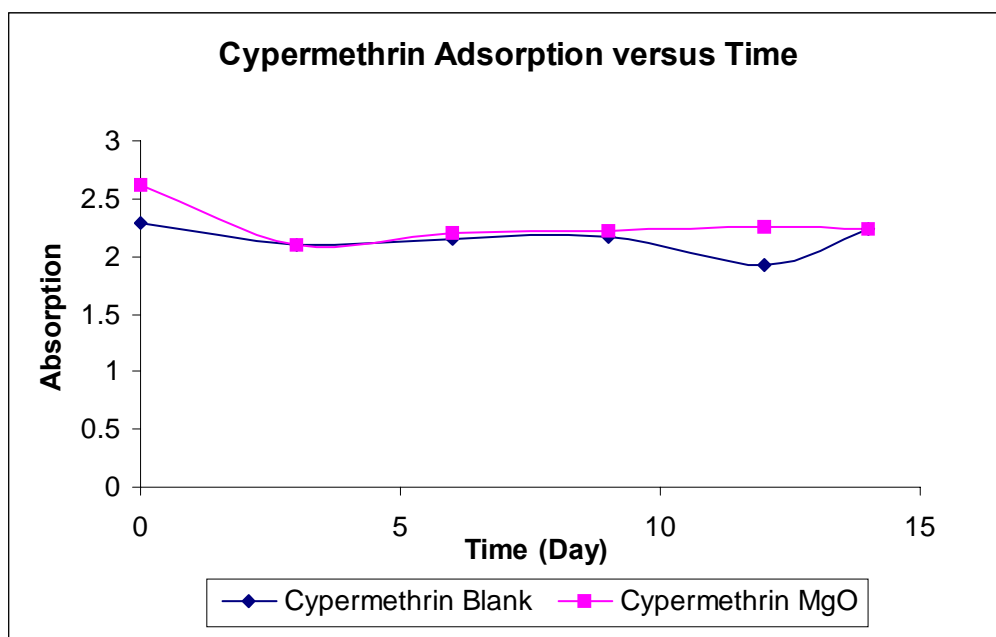


Figure 3.5 Graph absorption versus time of (I) Cypermethrin-Blank, and (II) Cypermethrin-MgO

five minutes, only one peak grew higher.

3.4 Scanning Electron Microscope (SEM)

The above figure shows SEM micrographs of MgO magnified at 1000 of commercial MgO and after activation at 600°C. Figure 5(a) represent Mg(OH)₂ obtained from the first method. Figure 5 (b) is D-Mgo, 3.4 (c) is DC-MgO and 3.4 (d) is SG-MgO. The results shows that commercially obtained MgO is

much more greater in size compared to activation MgO [7-9].

3.5 Stability of Cypermethrin

Samples were analyzed using UV-Vis and FTIR. For UV-Vis the adsorption of the samples were taken every three days, while for FTIR the spectrum was recorded every seven days.

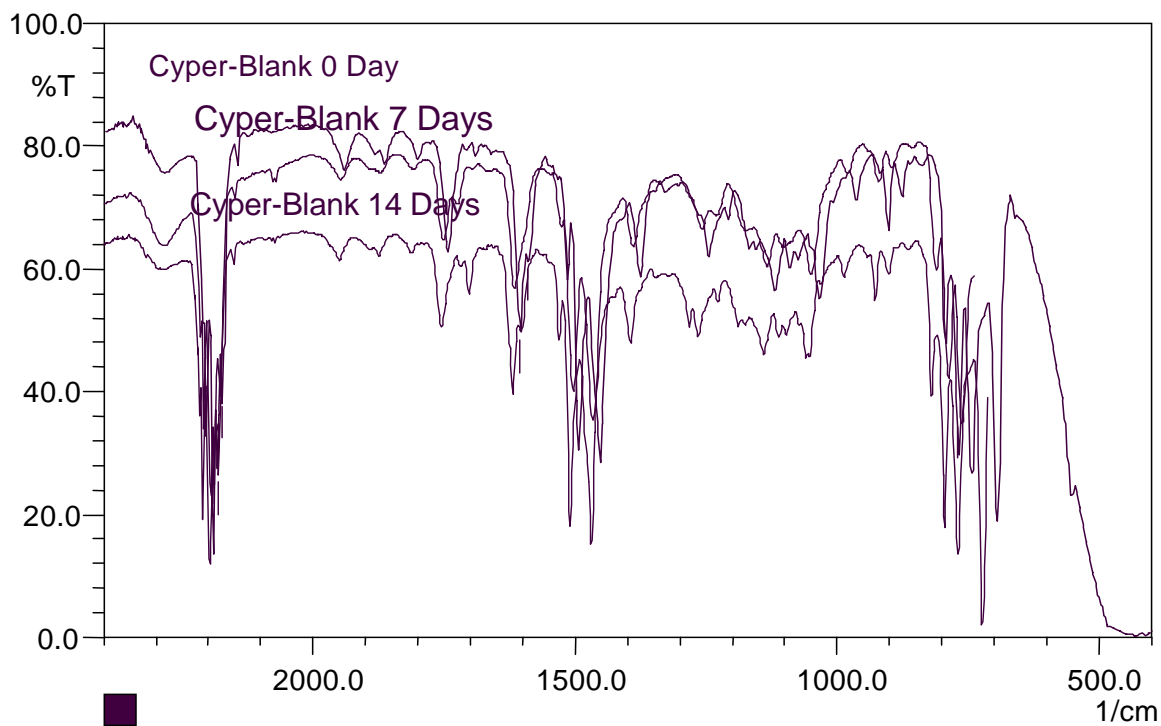


Figure 3.6 FTIR spectra of Cypermethrin Blank

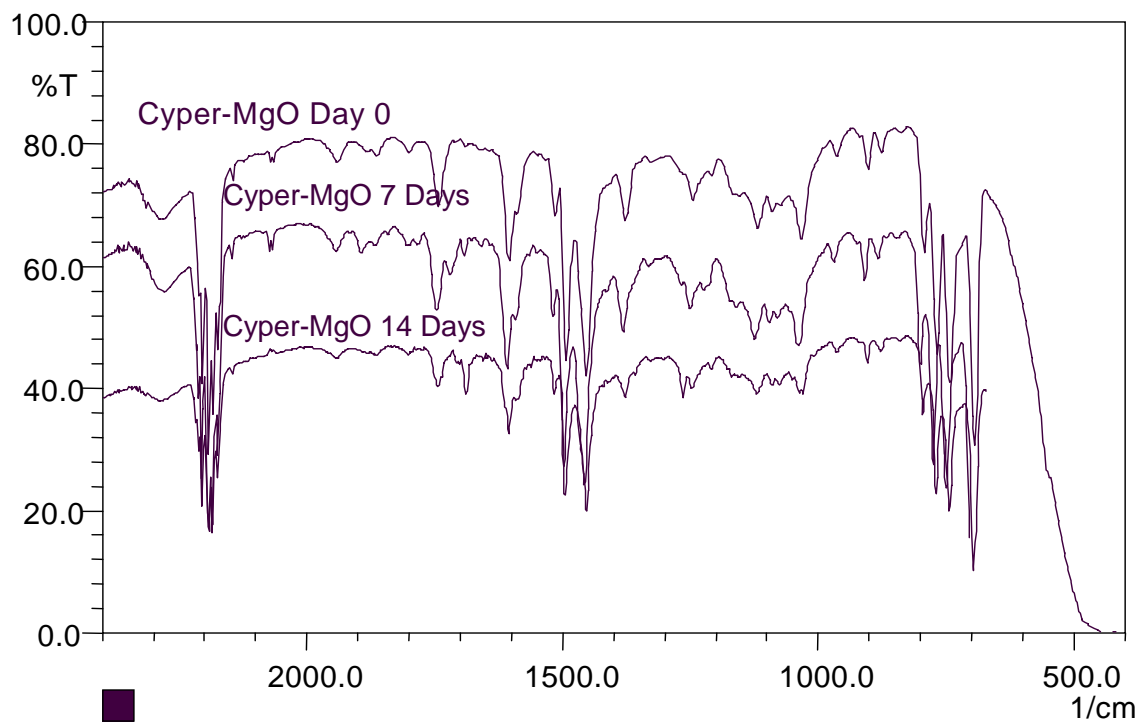


Figure 3.7 FTIR spectra of Cypermethrin + MgO

All the UV-Vis data were plotted into one

Table 3.1 IR stretching frequencies in Cypermethrin

Functional Group	Frequency (cm ⁻¹)
C-Cl	769.5, 744.5
CH aromatic	3026.1, 696.3
C≡N	2339.5
C=C	1604.7
C=O	1743.5
CO	1034.7, 1120.6
CH (stretch)	2871.8, 2928.7, 2964.4
CH (bending)	1454.2, 1439.8

graph. From the graph (Figure 6), shows after 3 days of incubation, concentration of cypermethrin in MgO, whilst it is more stable from blank. After more than 10 days, concentration for cypermethrin in blank however drops but increase again after 14 days of incubation. This is not so for cypermethrin in MgO.

The samples were also observed using FTIR to identify the peaks that present. Table 1 shows the functional group that has been identified.

According to IR spectrum from Figure 7, cypermethrin blank is still stable because the functional group still in the spectrum on the 14th day. While for FTIR spectra of cypermethrin + MgO are not stable because on day 14, C≡N peak was not seen in the spectrums thus possesses that cypermethrin has degrade to other materials. The report from Dee An Jones (1999), the major pathway of cypermethrin degradation is it will convert to phenoxy benzoic acid (PBA), dichlorovinyl dimethyl cyclopropanecarboxylic acid (DCVA) and eventually CO₂. this also conclude that the maximum limit of keeping cypermethrin insecticide is two years.

4. Acknowledgments

I would like to thank UTM and MOSTE (IRPA vot: 74185), for sponsoring the project.

5. References

1. Maria A. Aramendia, Victoriano Borau, Cesar Jimenez, Jose M. Marinas, Jose R. Ruiz, Francisco J. Urbano. "Influence of The

Preparation Method on The Structural and Surface properties of Various Magnesium Oxides and Their Catalytic Activity in The Meerwein-Ponndorf-Verley Reaction (2003)." *Applied catalysis A: General* 244. 207-215.

2. Erich Knozinger, Karl-Heinz Jacob, Surjit Singh and Peter Hofmann (1993). "Hydroxyl Group as IR Active Surface Probes on MgO Crystallite". *Surface Science*. 290. 388-402.
3. Kenneth J. Klabunde, Shawn Decker, Eric lucas and Olga Koper (1999). "How the Shape of Nanoparticles Affects Their Adsorption Properties". *Manhattan: Kansas State University*. 577-581.
- A. Hitmi, c. Barthomeuf and H. Sallanon (1999). "Rapid Mass Propagation of Chrysanthemum Cinerariaefolium Vis. By Callus Culture and Ability to Synthesise Pyrethrins". *Plant Cell Reports*. 19. 156-160.
4. Kenneth J. Klabunde, Jane Stark, Olga Koper, Cathy Mohs, Dong G. Park, Shawn Decker, yan Jiang, Issabelle Lagadic and Dajie Zhang (1996). "Nanocrystals as Stoichiometric Reagents with Unique Surface Chemistry". *J. Phys. Chem.* 100. 12142-12153.
5. D. F Shriver and P. W. Atkins (1999). "Inorganic Chemistry 3rd Edition". *United Kingdom: Oxford University Press*. 260-262.
6. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman and George S. Kriz Jr. (1992). "Pengenalan kepada Spektroskopi". *Translated Edition. Universiti Teknologi Malaysia*. 40-42.
7. Abdul Rahim Yacob, Hanis Mohd Yusoff (2003). "High Nanosurface Metal Oxides".

Abdul Rahim Yacob and Hanis bt Mohd Yusoff

- Abstract of the EXPO Science and Technology 2003. August 7-9. PWTC, Kuala Lumpur.
8. Abdul Rahim Yacob, Hanis Mohd Yusoff (2003). "High Nanosurface Metal Oxides". Abstract of the INATEX Exhibition. September 17-19. *Rumah ALUMNI: Universiti Teknologi Malaysia*.
9. Abdul Rahim Yacob, Hanis Mohd Yusoff, Nur Hafizah Adam (2003). "High Nanosurface Metal Oxides". *Proceedings of the IPTA Conference. October 9-12. PWTC, Kuala Lumpur*.
10. Dee An Jones (1999). "Environmental Fate of Cypermethrin". Environmental Monitoring and Pest Management. *Department of Pesticide Regulation: Sacramento*.

Tingkah Laku Kakisan Aloi Al-Zn Dan Al-Zn-Mg Dengan Unsur Pengaktif Sn Di Dalam Air Laut Tropika

Abdul Razak Daud¹⁾, Mahdi Che Isa¹⁾, Muhamad Daud²⁾, Mohd Yazid Ahmad³⁾

1) Pusat Pengajian Fizik Gunaan, Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia
ard@pkrisc.cc.ukm.my / mahdicheisa@yahoo.com

2) Institut Penyelidikan Sains dan Teknologi Nuklear Malaysia (MINT),
43000 Kajang, Selangor, Malaysia
mdaud@mint.gov.my

3) Institut Penyelidikan Sains dan Teknologi Pertahanan (STRIDE),
50634 Kuala Lumpur, Malaysia
mya.pst@mod.gov.my

Abstrak

Aloi aluminium merupakan antara bahan yang penting dalam industri lantaran keunikan sifatnya dan kepelbagaian penggunaannya. Aloi Al-5.5Zn dan Al-5.5Zn-2Mg mengandungi Sn telah difabrikasi melalui kaedah tuangan. Spektroskopi Impedans Elektrokimia (SIE) dan teknik pengutuban elektrokimia telah digunakan dalam mengkaji tingkahlaku elektrokimia permukaan dan kakisan aloi-aloi tersebut di dalam air laut tropika. Kadar kakisan dan hubungan keupayaan litar terbuka dengan masa dedahan telah ditentukan. Keputusan daripada kajian SIE menunjukkan yang unsur Sn bertindak sebagai unsur pengaktif kepada aloi aluminium dengan merendahkan impedans permukaan. Keputusan ini turut disokong oleh data daripada pengukuran kadar kakisan.

Kata Kunci : Aloi aluminium, impedans, kadar kakisan, stanum.

1. Pendahuluan.

Aloi aluminium merupakan satu bahan yang unik dengan kepelbagaian kegunaan sama ada untuk pembuatan peralatan di darat, laut maupun udara. Ini kerana ia mempunyai kombinasi ciri-ciri yang menarik seperti ketumpatan yang rendah, tahan kakisan, mudah direkabentuk dan mempunyai kekonduksian haba dan elektrik yang tinggi. Di dalam persekitaran marin, aloi aluminium digunakan sebagai anod korbanan dalam perlindungan kakisan. Walaupun aluminium secara relatifnya agak baru sebagai bahan anod korbanan, namun ia mempunyai merit yang cukup baik kerana mempunyai beberapa kelebihan yang boleh dieksploitasi seperti ringan, mudah direkabentuk, nilai teori bagi kapasiti arus yang tinggi (2800 Aj/Kg) dan mudah diperolehi.

Aluminium dialoikan dengan logam pengubahsuai seperti zink dan magnesium

manakala logam raksa, indium dan titanium pula sebagai bahan pengaktif (Salinas et al., 1999; Breslin et al., 1993). Namun kecekapannya semasa operasi berbeza-beza. Kecekapan anod korbanan turut dipengaruhi oleh pelbagai faktor seperti jenis aloi, proses solidifikasi, kecacatan dan mikrostruktur aloi, rawatan haba, komposisi kimia dan persekitaran penggunaannya (Lin & Shih, 1987). Walaupun unsur seperti raksa (Hg) atau indium (In) menunjukkan pembaikan terhadap sifat pengaktifan aloi aluminium tetapi penggunaan Hg berlawanan dengan sensitiviti perlindungan alam sekitar sementara In agak mahal, maka unsur pengaktif alternatif diperlukan. Justeru itu, kajian terhadap stanum (Sn) sebagai unsur pengaktif alternatif memerlukan pengetahuan mengenai teknik fabrikasi, proses pemejalan, kinetik pemendakan sebatian antaralogam serta taburan sebatian antaralogam di dalam matriks

Jadual 1: Komposisi kimia bagi aloi Al-5.5Zn dan Al-5.5Zn-2Mg

Aloi	Kandungan (%bt.)				
	Zn	Mg	Sn	Fe	Al
Al-5.5Zn	5.47	-	-	0.03	Baki.
Al-5.5Zn-2Sn	5.48	-	1.72	0.03	Baki.
Al-5.5Zn-2Mg	5.58	1.82	-	0.03	Baki
Al-5.5Zn-2Mg-2Sn	5.52	1.79	1.95	0.03	Baki

aluminium. Tujuan kajian ini adalah untuk memfabrikasi aloi aluminium yang ditambah dengan Sn dan melakukan pencirian terhadap tingkah laku kakisannya menggunakan kaedah elektrokimia. Keputusan yang diperolehi akan dihubungkan dengan kebolehan Sn sebagai unsur pengaktif kepada aloi berkenaan.

2. Percobaan

Semua aloi disediakan daripada logam berketulenan melebihi 99.99%. Logam di lebur pada suhu 800° C dan di tuang ke dalam acuan keluli berbentuk rod dengan diameter 18 mm. Bagi mengelakkan udara terperangkap di dalam acuan dan mengelakkan kecacatan yang disebabkan oleh lompong, mikroliang dan sebagainya semasa proses penuangan, acuan terlebih dahulu dipanaskan menggunakan relau pada suhu 150° C. Proses peleburan dan penuangan dilakukan di dalam persekitaran lengai (gas argon) untuk mengelakkan daripada pengoksidaan.

Komposisi kimia sampel ditentukan menggunakan spektrometer serapan atom model Spectra AA-10 dengan prosidur analisis mengikuti piawai ASTM E536-98 (1998). Jadual 1 menunjukkan komposisi kimia aloi yang disediakan. Difraktometer sinar-X model Bruker AXS dengan punca sinaran Cu_{α} turut digunakan bagi mengenalpasti kewujudan fasa-fasa tertentu dalam aloi aluminium yang dikaji. Imbasan dilakukan pada kadar 0.002°/saat dengan sudut imbasan 2θ dari 20° hingga 80°. Morfologi permukaan sampel sebelum ujian diperolehi menggunakan mikroskop konfokal imbasan laser model LSM Carl Zeiss 5 Pascal.

Kajian tingkah laku kakisan aloi aluminium di dalam air laut tropika, pH 8.2 pada suhu bilik, 27°C dilakukan menggunakan kaedah pengutuban elektrokimia. Kadar kakisan ditentukan daripada plot Tafel. Keupayaan litar terbuka bagi sampel diukur setiap 10 saat dalam tempoh 15 jam rendaman. Bagi kaedah elektrokimia arus ulang-alik pula, Spektroskopi Impedans Elektrokimia dijalankan pada julat frekuensi 1×10^{-3} Hz hingga 1×10^5 Hz dengan

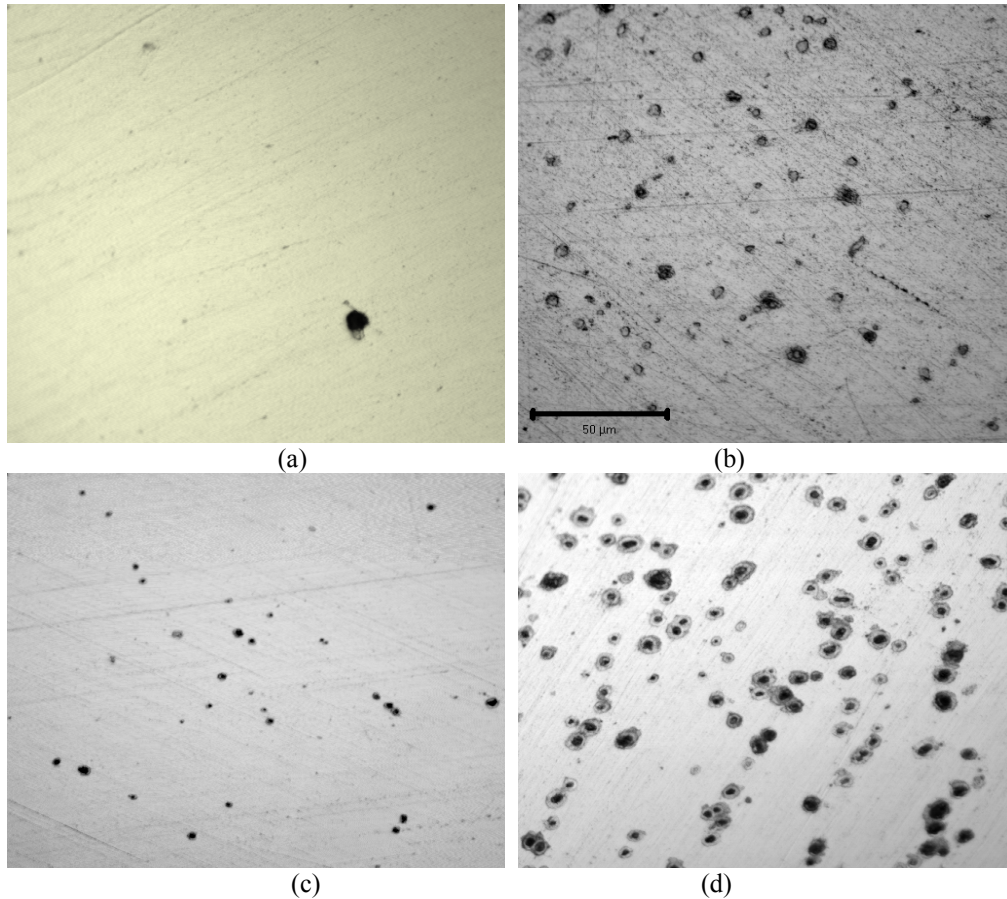
voltan ulang-alik kurang daripada 10 mV. Semua ujikaji elektrokimia dijalankan dengan menggunakan peralatan kajian kakisan dilengkapi dengan potentiostat/galvanostat Gamry model PC4-750 yang dikawal oleh perisian Gamry Framework V4.2.

3. Hasil dan Pembahasan

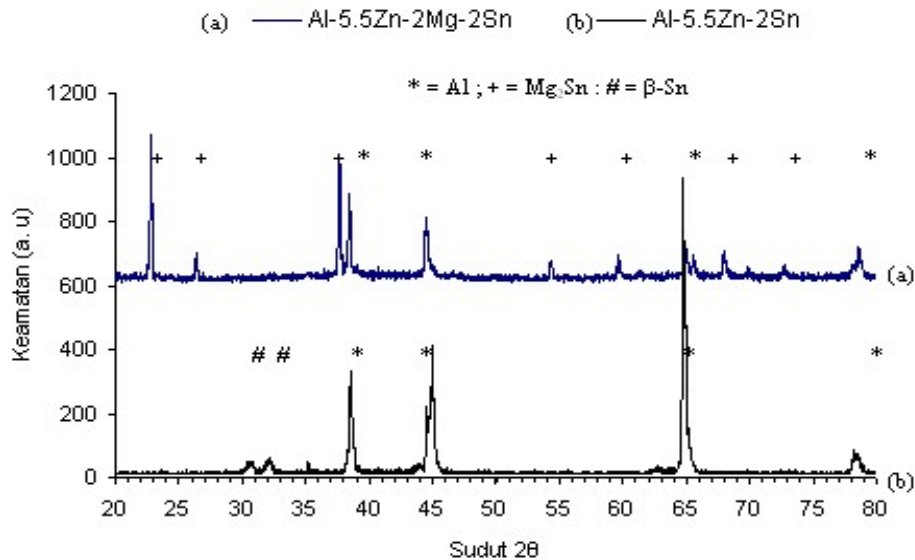
Morfologi Permukaan AloI Sebelum Ujian

Penelitian dengan mikroskopi konfokal imbasan laser ke atas sampel aloi tuangan yang digilap berkilat bagi mengkaji bentuk serta taburan mendakan yang mungkin wujud di dalam aloi tersebut. Rajah 1 menunjukkan mikrograf yang diperolehi daripada sampel aloi tuangan sebelum ujian. Rajah berkenaan menunjukkan sampel aloi yang mengandungi Sn mempunyai mendakan hitam yang lebih banyak serta tertabur lebih sekata berbanding dengan sampel tanpa Sn.

Maklumat mikroskopi konfokal imbasan laser mendapati diameter mendakan hitam bagi aloi Al-5.5Zn dan aloi Al-5.5Zn-2Mg dengan kehadiran 2% Sn adalah diantara 15-25 μm manakala aloi tanpa Sn pula terdapat sedikit mendakan hitam dengan saiz diantara 2-10 μm . Mikrograf yang ditunjukkan dalam Rajah 1 di atas juga sepadan dengan keputusan yang telah dilaporkan oleh penyelidik lain (Yuan et al. 2000; Guillaumin & Mankowski, 1998). Stanum mempunyai kelarutan pepejal yang amat rendah dalam logam aluminium sama ada pada suhu rendah maupun suhu tinggi (kira-kira 0.1%bt pada suhu 627 °C). Sehubungan dengan itu, ia akan tersingkir ke sempadan butiran, di celah-celah struktur dendrit atau membentuk sebatian antaralogam semasa proses solidifikasi. Kewujudan fasa sekunder telah disahkan dengan analisis pembelauan sinar-X (XRD) dimana sebatian antaralogam Mg_2Sn wujud di dalam aloi Al-5.5Zn-2Mg-2Sn sebagaimana yang ditunjukkan pada Rajah 2. Walau bagaimanapun tiada sebatian antaralogam dapat dikesan dalam aloi Al-5.5Zn-2Sn sebaliknya dipercayai mendakan hitam yang dilihat adalah fasa β -Sn



Rajah 1 Mikrograf daripada mikroskop konfokal imbasan laser bagi permukaan aloi Al-5.5Zn sebelum ujian (a) 0% Sn, (b) 2% Sn dan aloi Al-5.5Zn-2Mg (c) 0% Sn (d) 2% Sn



Rajah 2: Difraktogram XRD bagi (a) aloi Al-5.5Zn-2Mg-2Sn dan (b) Al-5.5Zn-2Sn

sepertimana ditunjukkan oleh puncak pembelauan pada Rajah 2. Maklumat mengenai mikrostruktur dan data XRD itu jelas menunjukkan kehadiran Sn mempengaruhi struktur permukaan aloi aluminium. Kecacatan pada permukaan akan menyebabkan

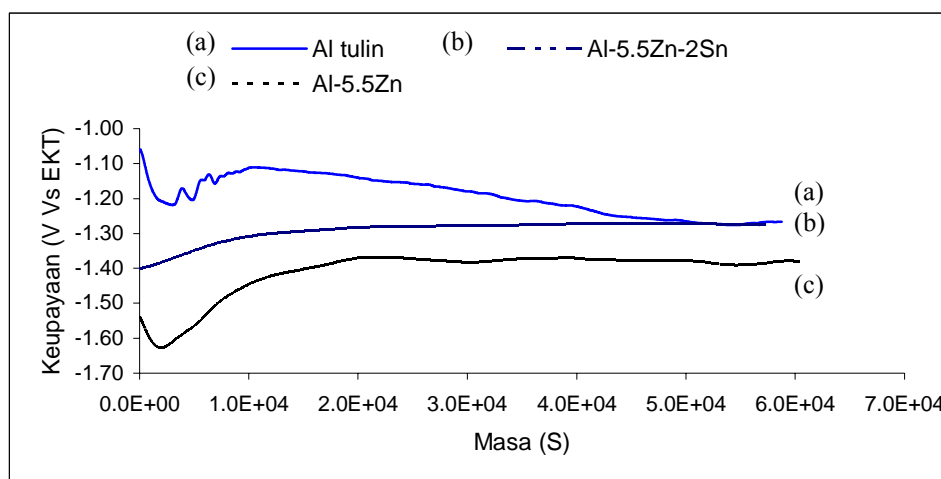
permukaan aloi menjadi lebih aktif dan mudah mengkakis.

Pengukuran Elektrokimia

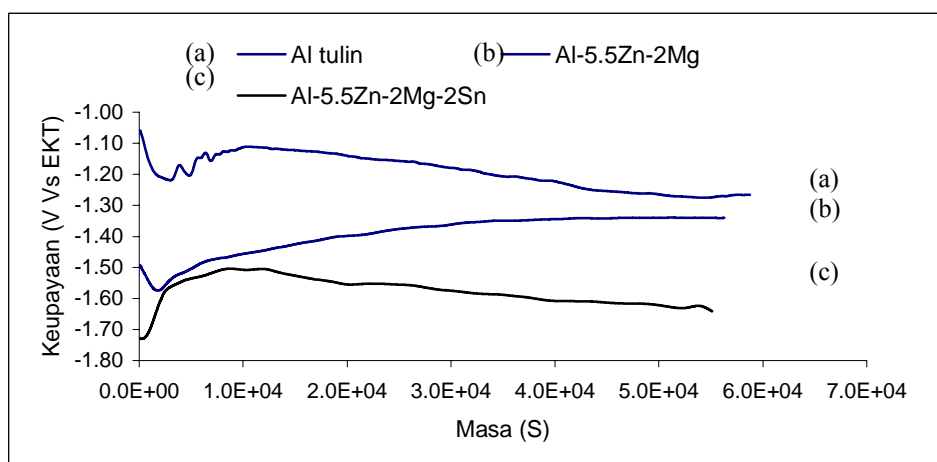
Cara yang sering digunakan bagi mengawasi tingkah laku kakisan bagi logam atau aloi ialah dengan cara merekod bacaan keupayaan litar terbuka terhadap masa rendaman. Rajah 3 dan 4 masing-masing menunjukkan kesan komposisi aloi keatas keupayaan litar terbuka merujuk kepada elektrod kalomel tepu (EKT) terhadap masa rendaman bagi Al-5.5Zn dan Al-5.5Zn-2Mg apabila direndam di dalam air laut selama 15 jam. Nilai purata keupayaan litar terbuka ditunjukkan di dalam Jadual 2. Pada permulaan rendaman, nilainya menokok kearah positif mengikut masa dan menjadi stabil selepas 5 jam rendaman. Keputusan ini menunjukkan fenomena fana (transient) pada

peringkat awal 5 jam rendaman sebelum stabil yakni mengalami perubahan keupayaan yang kecil sekitar 20-50 mVolt pada jam berikutnya. Keupayaan litar terbuka yang dicerap pada semua keadaan adalah akibat daripada tindak balas anodik dan katodik yang berlaku pada permukaan aloi. Penambahan Sn terhadap aloi Al-5.5Zn menyebabkan berlaku anjakan keupayaan kakisan ke arah positif disebabkan oleh sifat Sn yang lebih katodik berbanding Al dan Zn. Manakala penambahan 2%Mg kepada Al-5.5Zn menjadikan aloi tersebut lebih elektronegatif kerana Mg merupakan logam yang aktif.

Rintangan kakisan bagi aloi aluminium di dalam medium akueus boleh dinilai berdasarkan rintangan pengutuban yang ditunjukkan oleh keupayaan litar terbukanya.



Rajah 3 Perubahan keupayaan litar terbuka mengikut masa rendaman di dalam air laut tropika pada suhu 27 °C bagi (a) Al tulen, (b) Al-5.5Zn-2Sn (c) Al-5.5Zn.



Rajah 4 Perubahan keupayaan litar terbuka mengikut masa rendaman di dalam air laut tropika pada suhu 27 °C bagi (a) Al tulen, (b) Al-5.5Zn-2Mg, (c) Al-5.5Zn-2Mg-2Sn

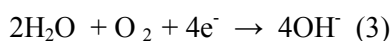
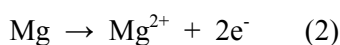
Rintangan pengutuban bergantung kepada keadaan permukaan aloi misalnya lapisan oksida atau hidroksida yang terbentuk pada permukaan aloi akan menyebabkan berlaku penambahan rintangan pengutuban. Sekiranya wujud lapisan oksida pelindung yang kuat dan homogen pada permukaan aloi maka sifat rintangan kakisan aloi berkenaan akan menjadi sangat tinggi. Ringkasnya, rintangan elektrik pada permukaan logam atau aloi merupakan parameter penting yang menentukan sifat rintangan kakisan logam atau aloi berkenaan. Lapisan oksida terbentuk dengan cepat pada permukaan aloi aluminium apabila terdedah kepada oksigen. Apabila kecacatan seperti rekahan, lompong atau lubang terbentuk didalam lapisan oksida, permukaan aktif aloi akan terdedah kepada medium. Spektroskopi impedans elektrokimia boleh digunakan untuk meneliti rintangan elektrik lapisan permukaan pada logam atau aloi.

Bagi sistem elektrokimia akueus, rintangan pengutuban R_p dinyatakan sebagai:

$$R_p = |Z_{\omega \rightarrow 0}| - |Z_{\omega \rightarrow \infty}| \quad (1)$$

$|Z_{\omega \rightarrow \infty}|$ ialah modulus impedans yang merujuk kepada rintangan elektrolit, manakala $|Z_{\omega \rightarrow 0}|$ adalah modulus impedans permukaan logam.

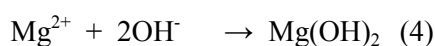
Rajah 5, 6 dan 7 masing-masing menunjukkan plot Nyquist bagi Al tulen, aloi Al-5.5Zn dan Al-5.5Zn-2Mg selepas rendaman selama 1 hingga 8 jam. Keputusan jelas menunjukkan aloi-aloi aluminium yang dikaji mempunyai lapisan permukaan yang berbeza disegi sifat rintangan maupun kapasitannya. Logam Al tulen dan aloi Al-5.5Zn menunjukkan nilai rintangan dan kapasitan yang hampir sama untuk masa rendaman 1 jam. Namun selepas 8 jam rendaman, ternyata aloi Al-5.5Zn memberikan modulus impedans yang lebih rendah, menandakan kehadiran Zn di dalamnya berupaya merubah tingkah laku elektrokimianya. Namun apabila Al-5.5Zn dialoikan pula dengan Mg modulus impedansnya kembali meningkat. Dipercayai kehadiran logam Mg akan mengakibatkan terbentuknya lapisan pasif $Mg(OH)_2$ mengikut persamaan dibawah:



Tindak balas separa bagi persamaan di atas memberikan tindak balas keseluruhan:

Jadual 2: Bacaan purata nilai keupayaan litar terbuka bagi aloi yang diuji.

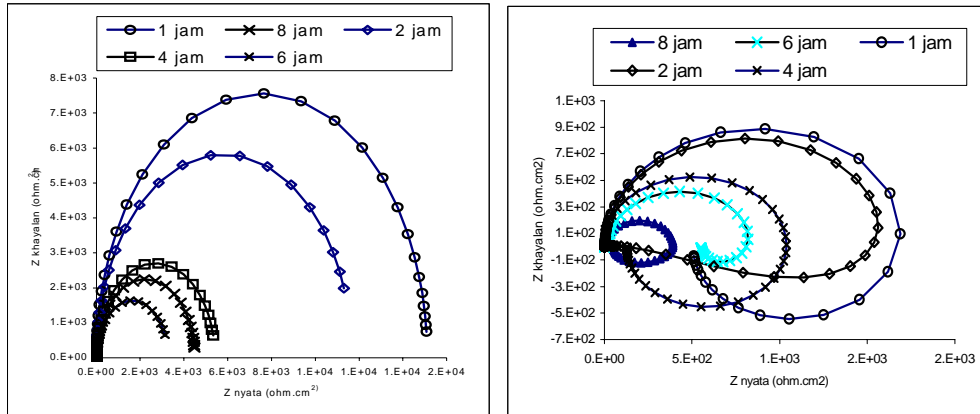
Sampel	Purata Keupayaan Litar Terbuka, V(EKT)
Al tulen	-1.23 ± 0.04
Al-5.5 Zn	-1.50 ± 0.05
Al-5.5Zn-2Sn	-1.33 ± 0.08
Al-5.5 Zn-2Mg	-1.40 ± 0.02
Al-5.5Zn-2Mg-2Sn	-1.62 ± 0.09



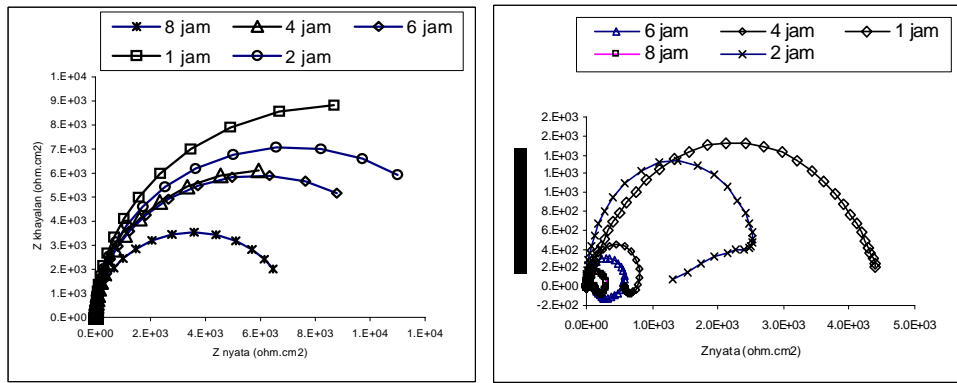
Pembentukan lapisan ini mengurangkan aktiviti elektrokimia dipermukaan aloi kerana rintangan elektriknya bertambah. Keputusan spektroskopi impedans elektrokimia didapati bersetuju dengan nilai keupayaan litar terbuka bagi aloi pada Jadual 2 dimana kehadiran Mg pada aloi Al-5.5Zn menyebabkan keupayaan litar terbukanya menjadi lebih positif.

Aloi tanpa Sn jelas menunjukkan rintangan dan kapasitan yang jauh lebih tinggi disegi magnitudnya berbanding aloi aluminium yang mengandungi Sn (Rajah 5 dan 6). Pertambahan masa rendaman menunjukkan berlaku pengecilan kepada lengkung separuh bulatan bagi data impedans. Bagi aloi yang mengandungi Sn pula lengkung spektroskopi impedans elektrokimia masing-masing mempunyai gegelung aruhan pada frekuensi rendah dan memberi nilai impedans atau rintangan dan kapsitan yang lebih rendah (Rajah 5(b) dan Rajah 6(b)). Wujudnya gegelung aruhan mempunyai kaitan dengan proses jerapan dan santaian spesies Sn^{2+} yang terhasil oleh aktiviti elektrokimia pada permukaan aloi. Impedans pada bahagian frekuensi rendah merujuk kepada proses pemindahan cas atau elektron yang menyebabkan berlaku peningkatan atau penurunan rintangan. Peningkatan nilai modulus impedans akan menghasilkan lengkung separuh bulatan yang lebih besar dan sebaliknya menjadi lebih kecil jika impedans berkurang. Oleh itu Sn jelas bertindak sebagai pengaktif aloi berkenaan yakni membantu pelarutan unsur-unsur dari aloi ke dalam medium.

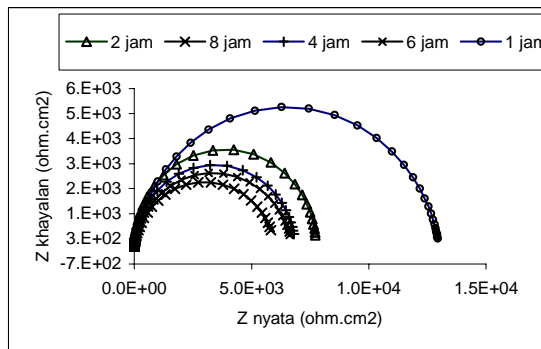
Apabila aloi Al yang mempunyai lapisan pelindung oksida terdedah kepada elektrolit agresif, nilai impedans ditentukan oleh



Rajah 5 Plot Nyquist bagi perubahan impedans pada keupayaan litar terbuka dengan masa rendaman bagi aloi (a) Al-5.5Zn (b) Al-5.5Zn-2Sn



Rajah 6 Plot Nyquist bagi perubahan impedans pada keupayaan litar terbuka dengan masa rendaman bagi aloi (a) Al-5.5Zn-2Mg (b) Al-5.5Zn-2Mg-2Sn



Rajah 7 Plot Nyquist bagi perubahan impedans pada keupayaan litar terbuka dengan masa rendaman bagi logam Al tulen

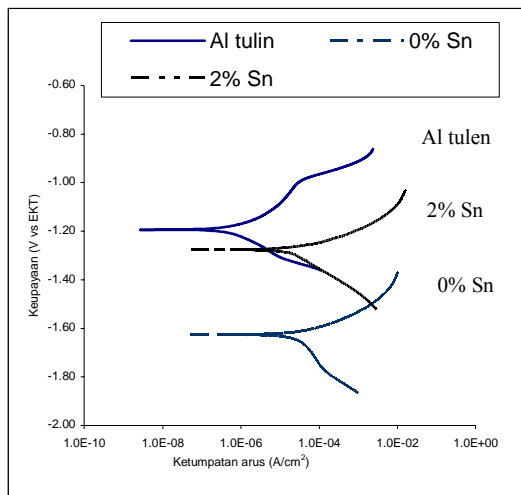
rintangan dan kapasitan lapisan tersebut. Kehadiran Sn dalam bentuk Mg_2Sn bagi aloi Al-Zn-Mg-Sn atau $\beta-Sn$ bagi aloi Al-Zn-Sn akan menyebabkan lapisan oksida yang terbentuk pada permukaan aloi mempunyai kecacatan dan tidak homogen. Kecacatan pada lapisan oksida menyebabkan rintangan elektrik pada lokasi berkenaan menjadi rendah oleh

yang demikian ia akan menyediakan ruang untuk inisiasi kakisan. Peranan sebatian antaralogam dalam mengaktifkan aloi Al-Mg-Zn turut dilaporkan oleh Barbucci et al. (1998).

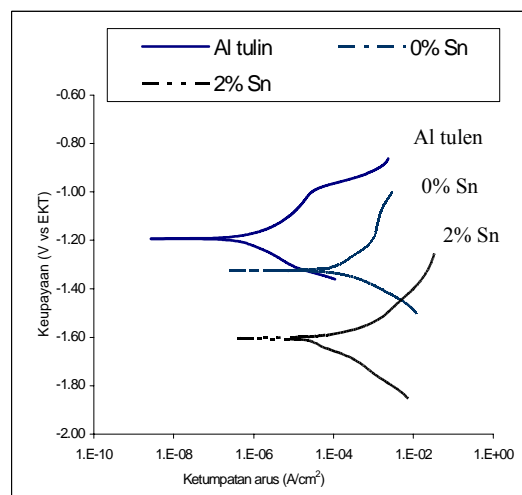
Daripada plot Tapel seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 8 menunjuk kehadiran unsur-unsur aloian, Zn, Mg dan Sn menyebabkan aloi mempunyai keupayaan kakisan yang lebih

Jadual 3 Keupayaan dan kadar kakisan bagi Al tulen dan aloi Al di dalam air laut yang diperolehi daripada plot Tafel.

Aloi	E_{kakis} mV(EKT)	I_{kakis} ($\mu A.cm^{-2}$)	Kadar Kakisan ($\mu m/tahun$)
Al tulen	-1200	1.2	0.13×10^2
Al-5.5 Zn	-1660	23.2	2.65×10^2
Al-5.5Zn-2Sn	-1290	36.3	4.15×10^2
Al-5.5 Zn-2Mg	-1370	129.0	14.79×10^2
Al-5.5Zn-2Mg-2Sn	-1620	162.0	18.53×10^2



(a)



(b)

Rajah 8 Plot Tafel bagi Al tulen dan aloi Al di dalam air laut tropika, pH 8.2, suhu 27 °C (a) Al-5.5Zn (b) Al-5.5Zn-2Mg

negatif bermakna aloi-aloi ini bersifat lebih anodik berbanding dengan Al tulen. Kehadiran Sn pula menampakkan peningkatan kadar kakisan yang ketara berbanding dengan Al tulen dan masing-masing aloi Al-5.5Zn dan Al-5.5-2Mg (Jadual 3). Kadar kakisan aloi-aloi ini jelas menyokong keputusan yang diperolehi daripada kajian spektroskopi impedans elektrokimia iaitu aloi yang mempunyai rintangan dan kapasitan yang tinggi memberikan nilai kadar kakisan yang rendah. Keputusan ini seterusnya mengesahkan yang Sn memainkan peranan sebagai pengaktif aloi aluminium terutamanya aloi aluminium yang mengandungi magnesium.

4. Kesimpulan

Kajian tingkah laku kakisan aloi Al-Zn dan Al-Zn-Mg di dalam air laut tropika telah memperlihatkan yang unsur aloian Sn dapat bertindak sebagai unsur pengaktif aluminium dengan berkesan. Kewujudan Sn dalam aloi Al-Zn dan Al-Zn-Mg dalam bentuk Mg_2Sn atau β -

Sn telah menyebabkan lapisan oksida pelindung yang terbentuk pada permukaan aloi mempunyai kecacatan dan tidak homogen. Kecacatan lapisan oksida pelindung menurunkan rintangan permukaan aloi dan menyebabkan aloi menjadi aktif dan kadar kakisannya meningkat. Peranan Sn sebagai unsur pengaktif aloi aluminium menjadi lebih ketara dengan kehadiran Mg di dalam aloi tersebut.

5. Ucapan Terimakasih

Para penulis merakamkan penghargaan kepada Kerajaan Malaysia di atas sokongan kewangan melalui geran penyelidikan, IRPA 09-02-02-0118-EA295. Penghargaan juga kepada Institut Penyelidikan Sains dan Teknologi Pertahanan (STRIDE), Kementerian Pertahanan Malaysia di atas kemudahan peralatan penyelidikan yang dibekalkan.

6. Rujukan

ASTM E 536-98. (1998). ASTM Standards test methods for chemical analysis of zinc and zinc

- alloys. Designation E-1998, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Barbucci, P., Cabot, L., Bruzzone, G., Cerisola, G., (1998). Role of intermetallics in the activation of Al-Mg-Zn alloys. *J. of Alloys & Comp.*, **268**, 295-301.
- Breslin C. B., Friery, L. P., Carrol, W. M., (1993). Influence of impurity elements on electrochemical activity of aluminium activated by indium. *Corrosion*, **49**(11), 895-902.
- Guillaumin V., Mankowski. G., (1998). Localized corrosion of 2024 T351 aluminium in chloride media. *Corr. Sci.*, **41**, 421-438.
- Lin, J. C., Shih, H. C., (1987). Improvement of the current efficiency of Al-Zn-In anode by heat treatment. *J. of Electrochem. Soc.*, **134**(4), 817-823.
- Salinas, D. R., Garcia, S. G., Bessone, J. B., (1999). Influence of alloying elements and microstructure on aluminium sacrificial anode performance: case of Al-Zn. *J. of Applied Electrochemistry*, **29**, 1063-1071.
- Yuan G. C., Li Z. J., Lou Y. X., Zhang, X. M., (2000). Study on crystallization and microstructure for new series of Al-Sn-Si alloys. *Mat. Sci. Eng.*, **A280**, 108-115.



Preparation of Nickel Nanofilm onto Gold Thin Film by Electrodeposition Using Glucopone as Surfactant

Abdul Razak Daud, Dahyunir Dahlan, Shahidan Radiman

School of Applied Physics, Faculty of Science and Technolog
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM-Bangi, Selangor, Malaysia.
ard@pkrisc.cc.ukm.my / dahyunir@yahoo.com / shahidan@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Preparation of nickel nanofilm onto gold thin film substrates by electrochemical deposition is reported. Electrochemical deposition was carried out using 0.1 M NiSO₄ solutions that contains 10 wt.% glucopone as surfactant. It was carried out under a potential of 2V for 120 seconds by using continuous current. A standard three-electrode cell was used for deposition. Morphology and composition of nanoparticles were studied by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-ray analysis (EDX) respectively. Estimation using SEM images indicated that the thickness of nickel film was about 50 nm. The distribution of Ni particles in the film is very uniform.

Keywords : *Electrochemical deposition, glucopone, gold substrate, nickel nanofilm.*

1. Introduction

Nickel nanoparticles have important application as catalysts or as conducting and magnetic materials. The superparamagnetic properties in particular, have been extensively studied using assembly of carbon encapsulated nickel, Ni(C) nanoparticles (Sun and Toledo (2002). Mandal et al., 2003 reported a wet chemical method for synthesis of superparamagnetic alloyed Ni-Pd and Ni-Pt nanomagnet in micelles.

Recently, electroplating has been utilized to prepare nanoparticles, since this technique is usually much cheaper, simpler and relatively more efficient than other techniques. It produces materials which have densities of 95 to 99% of the bulk reference materials (Przenioslo et al., 2001). Nickel deposition is one of the commonest electroplating processes where the particle size can be controlled by bath composition, pH value, hydrodynamic condition and special current shape (Natter & Happleman, 2003). The presence of surfactant and organic additives could affect nucleation and growth kinetics of metal particles under

potentiostatic condition (Peycova et al., 1995).

The surfactants stabilize nano-reactors and provide a cage like effect that inhibits the excess particle growth and agglomeration when the particle size approaches that of water nanodroplets. Our research group has developed novel glycolipids as surfactants to synthesize nanoparticles. Glycolipids are amphiphiles which bear oligosaccharides as their hydrophilic headgroups (Hato et al. 1999). The interesting features of the glycolipids are readily biodegradable, non-ionic and non-toxic (Ryan & Kaler, 2001).

Glucopone is one of the glycolipid surfactants shows different crystalline phases namely, hexagonal phase, cubic phase and lamellar liquid crystalline phase. At high water concentration, the phase diagram of glucopone system showed an isotropic single phase solution region (Siddig et al., 2004). However, not many researches using glucopone as surfactant in electrodeposition have been reported, especially for preparation of material in nanometer scale.

The purpose of this work is to synthesize nickel nanofilms from nickel sulphate solution containing gluconate as a surfactant by electrodeposition onto gold thin film substrates.

2. Experimental

Gold thin film substrates, estimated thickness of about 100 nm were produced via evaporation onto glass slides using Sputter Coater SC 500. The substrates were cut into 5 mm x 25 mm and each of them was attached with a copper wire on their back part using silver paint. They were then washed in distilled water and dried.

Nickel sulphate ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was obtained from Sigma Aldrich; Gluconate 215 CU SP (a technical grade alkyl polyglucosides) was supplied by Fluka Chemical. Double distilled-deionized water was used to prepare 0.1M NiSO_4 solution. For solution containing gluconate, the weight ratio of 0.1M NiSO_4

solution to gluconate used was 9:1. The solution was stirred for one hour. Electrodeposition process was carried out in a cell comprising three electrodes. A graphite rod and a saturated calomel electrode were employed as the counter electrode and reference electrode respectively while a gold thin film substrate acted as working electrode. A laboratory DC power supply, GPR-1830 was used to provide electrical potentials with the current density of 10 to 60 $\mu\text{A cm}^{-2}$. Once the electrodeposition process was complete, the substrate was then removed from the solution and cleaned by soaking in deionized water.

3. Results and Discussion

Figure 1 shows deposition of nickel on a gold thin film using continuous current at applied potential of 2V for 120 seconds. Electrodeposition using 0.1 M NiSO_4 solution

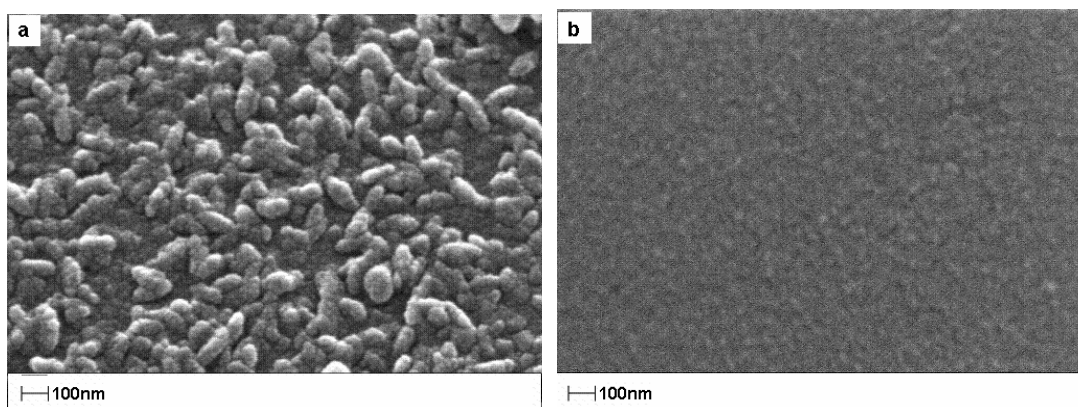


Figure 1. SEM micrograph of surface nickel nanofilm electrodeposited onto a thin film of gold at 2 volts with continuous current for 120 seconds using solution of (a) 0.1M NiSO_4 and (b) 0.1M NiSO_4 + 10% gluconate

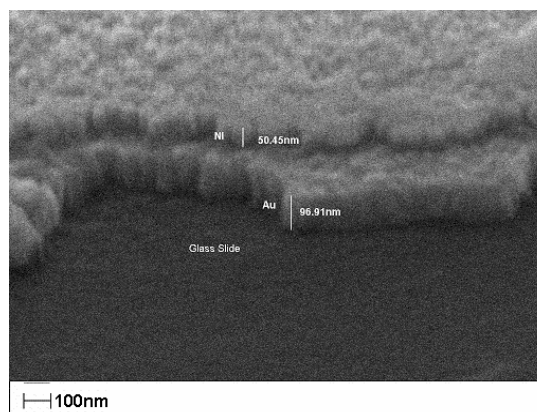


Figure 2. Cross section of a sample indicating Ni nanofilm layered on a gold thin film substrate deposited on a glass slide.

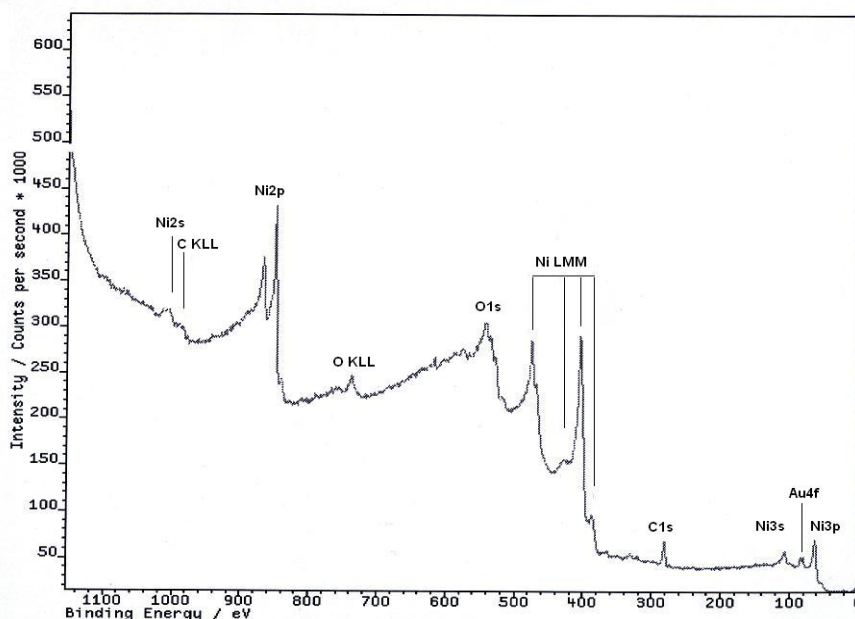


Figure 3. An XPS spectrum of Ni nanofilm prepared by electrodeposition using solution of 0.1M NiSO₄ +10% gluconate

without gluconate addition has produced agglomerated nickel particles layer on the surface of substrate (Figure 1(a)). However, the addition of gluconate to the solution has produced very tiny Ni particles and they were distributed very uniformly all over the surface of the substrate (Figure 1(b)). It seems that gluconate 215 CUSP has reduced the nickel particle growth or agglomeration during electrodeposition process. Figure 2 shows the cross section of the sample shown in Figure 1(b). A cross sectional view of sample shown in Figure 1 indicated that a dense layer of Ni particles was formed. No stacking fault between particles, which could be seen for this sample. The thickness of nickel layer was about 50 nm.

In order to confirm the presence of Ni film on the surface of the gold substrate, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was performed. Figure 3 shows the XPS spectrum of the nickel film where Ni and Au are clearly indicated. The peaks at 850 and 872 eV correspond to Ni_{2p_{3/2}} and Ni_{2p_{1/2}} signals respectively. The presence of C and O might be due to residual solution or surface contamination by environment during sample handling. The low intensity of Au peak at about 82 eV indicated that nickel film formed on gold is thin enough, sufficiently allows electrons of gold atoms emerged from its surface. The mean

free path of the electrons within solid samples is less than 2 nm so the typical information depth for XPS is about 5 nm.

4. Conclusion

Gluconate 215 CUSP can reduce the agglomeration of nickel particles in electrodeposition process. When gluconate is added into 0.1M NiSO₄ solution, the size of Ni particles became very fine and the particles were closely packed and uniformly distributed. The thickness of nickel nanofilm produced was about 50 nm.

5. Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the Government of Malaysia for funding this work through research grant IRPA 09-02-02-0032-SR0004/04/04.

6. Reference

- Hato M., Minamikawa H., Tamada K., Baba T., Tanabe Y., (1999). Self-assembly of Synthetic Glycolipid/Water System, *Advances in Colloid and Interfaces Science*, **80**, 233-270.
- Mandal M., Kundu S., Ghosh S.K., Sau T.K., Yusuf S.M., Pal T., (2003). Wet Chemical Method for Synthesis of Superparamagnetic alloyed Ni-Pd and Ni-Pt Nanomagnets in micelles, *Journal of Colloid and Interfaces Science*, **265**, 23-28.
- Natter H., Happelmann R., (2003). Tailor-made Nanomaterial Designed by Electrochemical Methods, *Electrochimica Acta*, **49**, 51-61.

Abdul Razak Daud, Dahyunir Dahlan, Shahidan Radiman

Peycova M., Michailova E., Stoychev D., Milchev A., (1995). Galvanostatic Studies of the Nucleation and Growth Kinetics of Copper in the Presence of Surfactant, *Electrochimica Acta*, **40**(16), 2595-2601.

Przenioslo P., Wagner J., Natter H., Hampelmann R., Wagner W., (2001). Studies of the Fractal Microstructure of Nanocrystalline and Amorphous Chromium Obtained by Electrodeposition, *Journal of Alloys and Compounds*, **328**(1-2), 259-263.

Ryan L.D., Kaler E.W., (2001). Alkyl Polyglucoside Microemulsion Phase Behavior, *Colloids and Surfaces A*, **176**, 69-83.

Siddig M.A., Radiman S., Muniandy S.V., Jan L.S., (2004). Structure of Cubic Phase in Ternary Systems Glucopone/water/hydrocarbon, *Colloids and Surfaces A*, **236**, 57-67.

Sun X.C., Toledo J.A, (2002). Magnetic and Microstructural Properties of Assembly of Ni(C) Nanoparticles, *Current Applied Physics*, **2**, 113-116.

Aktiviti Antioksidasi Beberapa Tumbuhan Tempatan Serta Kesannya Ke Atas Mutu Simpanan Burger Ayam

Abdul Salam Babji, Norrakiah Abdullah Sani, Nur Huda Faujan dan Rohasmizah Hashim

Program Sains Makanan, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600, Bangi, Selangor, Malaysia.
E-mail: daging@pkriscc.chem.ukm.my

Abstrak

Kajian dijalankan ke atas 7 formulasi burger ayam tua berlemak sawit untuk melihat kesan penyimpanan selepas penambahan ekstrak tumbuhan tempatan. Tujuh formulasi tersebut ialah burger ayam tua ditambah 400 ppm ekstrak ulam raja, 200 ppm ekstrak daun kesum dan 1000 ppm ekstrak daun kari. Dua formulasi lain ditambah dengan 200 ppm BHT dan 200 ppm BHA sebagai perbandingan antioksidasi sintetik dan semulajadi hasil ekstrak tumbuhan tempatan. Burger ayam tua yang tidak ditambah dengan apa-apa bahan bertindak sebagai sampel kawalan pertama dan formulasi menggunakan ayam muda sebagai sampel kawalan kedua. Tumbuhan yang dikaji ialah ulam raja (*Cosmos caudatus*), kesum (*Polygonum hydropiper*), selom (*Oenanthe javanica*), pegaga (*Centella asiatica*) dan daun kari (*Murayya koenigii*). Analisis yang telah dijalankan ke atas ekstrak ialah kandungan komponen fenolik jumlah dan ujian penurunan Fe^{3+} (FRAP). Ujian asid tiobarbiturik (TBA) dan ujian peroksida (PV) dijalankan ke atas burger sepanjang tempoh 3 bulan penyimpanan sejukbeku. Kandungan komponen fenolik jumlah tertinggi diperolehi dari ekstrak daun kari dengan pelarut etanol dan metanol masing-masing bernilai 423.09 mgTAE/kg berat segar dan 386.03 mgTAE/kg berat segar. Kesum dengan pelarut air memperolehi ekstrak tertinggi sebanyak 443.47 mgTAE/kg berat segar ($P < 0.05$). Hasil ujian FRAP, ekstrak air kesum mempunyai aktiviti penurunan tertinggi. Hasil analisis TBA bagi burger menunjukkan sampel mentah dengan penambahan ekstrak 200 ppm daun kesum dan 1000 ppm daun kari dapat melambatkan proses pengoksidaan dengan signifikan ($P < 0.05$) dan setanding dengan 200 ppm BHT. Analisis PV sampel mentah pula menunjukkan nilai PV meningkat sepanjang 2 bulan pertama tetapi menurun pada bulan ketiga. Hitung piring jumlah dan kiraan yis dan kulat bagi semua perlakuan adalah menurun sepanjang 3 bulan tempoh penyimpanan dan tidak menunjukkan sebarang perubahan yang signifikan. Perubahan fizikokimia tidak menjejaskan penerimaan pengguna berdasarkan ujian sensori yang telah dilakukan pada bulan 0 dan 3 tempoh penyimpanan.

Kata kunci: antioksidasi semulajadi, antioksidasi sintetik, pengoksidaan lipid dan burger ayam tua

1. Pendahuluan

Lipid mengandungi asid lemak politattepu dan ikatan esternya mudah dioksidakan oleh molekul oksigen. Daging yang mengandungi asid lemak mudah mengalami kemerosotan kualiti semasa penyimpanan disebabkan oleh pengoksidaan asid lemak (El-Alim *et al.*, 1999). Pengoksidaan lipid merupakan satu kebimbangan yang utama dalam industri daging (Halliwell *et al.*, 1995) dan ikan (Auborg,

1999) kerana memberi petunjuk kepada perkembangan ketengikan yang tidak diinginkan dan berpotensi menghasilkan produk yang toksik. Produk teroksida daripada pengoksidaan lipid dikaitkan dengan penyakit seperti arterosklerosis, penyakit gastro dan kanser (Yagi *et al.*, 1987). Komponen fenolik yang hadir dalam tumbuhan membolehkan bahan-bahan ini bertindak sebagai antioksidasi (Al-Jalay *et al.*, 1987) oleh itu dapat

memanjangkan jangka hayat makanan. Komponen fenolik mempunyai aktiviti antioksidatif yang lebih berkesan berbanding perlakuan bahan antioksidan semulajadi α -tokoferol dan ini setanding dengan bahan antioksidan sintetik hidroksianisol terbutil (BHA) dan hidroksitoulena terbutil (BHT) (Nakatani, 1992). Aktiviti antioksidan komponen fenolik sebahagian besarnya adalah kerana bahan redoks yang membenarkan komponen fenolik ini bertindak sebagai agen penurun, penderma hidrogen dan menyingkirkan oksigen tidak berpasangan. (Rice-Evans *et al.*, 1995).

Bahan antioksidan sintetik seperti BHT dan BHA telah lama digunakan dengan meluas untuk merendahkan kadar pengoksidaan lemak. Bagaimanapun terdapat keengganan untuk menggunakan bahan tambahan sintetik termasuk bahan antioksidan dalam makanan (Ahn *et al.*, 2002; Madsen dan Bertelsen, 1995). Bahan antioksidan sintetik seperti BHA (Sherwin, 1990) dan BHT (Sun dan Fukuhara, 1997; Chen *et al.*, 1992) dikatakan boleh menjadi karsinogenik dan kegunaannya dalam industri makanan semakin berkurang. Kini banyak usaha dilakukan untuk memperolehi bahan antioksidan melalui sumber semulajadi contohnya tumbuhan dan rempah. Bahan semulajadi lebih selamat dan berasal dari sumber yang boleh diperbaharui. Maka objektif kajian ini adalah untuk mengkaji aktiviti antioksidan beberapa jenis tumbuhan semulajadi di Malaysia dan menilai keberkesanan bahan antioksidan semulajadi berbanding antioksidan sintetik dalam produk burger ayam tua.

2. Percobaan

Pengekstrakan Sampel

Sampel ulam raja (*Cosmos caudatus*), kesum (*Polygonum hydropiper*), selom (*Oonanthe javanica*), pegaga (*Centella asiatica*) dan daun kari (*Murayya koenigii*) diperolehi dari Pasar Bangi, Selangor. Sampel terlebih dahulu dibersihkan dan dikeringkan pada suhu 50°C semalaman dan kemudian dikisar. Pengekstrakan sampel dilakukan dengan menggunakan etanol dan metanol yang direndam dalam nisbah sampel:pelarut (1:6) selama tujuh hari. Suhu rendaman sekitar 25°C. Rendaman ditutup dengan parafilm supaya pelarut tidak meruap. Pengekstrakan dengan air dilakukan pada nisbah sampel:air

(1:3) dengan menggunakan sampel segar. Sampel yang telah direndam dan dikisar kemudiannya dituras. Pelarut disejatkan pada suhu sekitar 50-55°C. Hasil ekstrak dikumpul, ditimbang dan disimpan pada suhu 0-4°C bagi mengelakkan pertumbuhan kulat.

Analisis Kandungan Komponen Fenolik Jumlah

Penentuan kandungan komponen fenolik jumlah ditentukan dengan menggunakan kaedah Singleton dan Rossi (1965) menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* dengan menganggap kandungan fenolik adalah Kesetaraan Asid Tanik (TAE). Lengkuk piawai bagi asid tanik disediakan dan penyerapan dibaca pada jarak gelombang 760nm menggunakan spektrofotometer (Model JENWAY 6100) setelah disifarkan dengan larutan pengosong. Nilai kandungan komponen fenolik jumlah diperolehi berdasarkan pengiraan berikut:

Kandungan Komponen fenolik Jumlah (mg TAE/ 100g berat basah sampel)

$$W \quad 100 = \frac{10RD}{D} \times \frac{1}{W} \times \text{peratus berat basah sampel}$$

Dimana; R= Bacaan dari Lengkuk Piawai, D= Faktor Pencairan, W= Berat Ujian

Ujian Kuasa Antioksidan Penurunan Ferum (III) (FRAP)

Ujian ini dibuat merujuk kepada kaedah Oyaizu (1986). Setiap sampel dianalisis pada kepekatan 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm dan 1200 ppm. Setiap sampel telah ditambahkan dengan 1.0 ml air suling, 2.5 ml penimbal fosfat (0.2M, pH 6.6) dan 2.5 ml $K_3Fe(CN)_6$ (1%). Larutan dieramkan dalam inkubator selama 20 minit pada suhu 50°C. Sebanyak 2.5 ml asid trikloroasetik (10%) ditambah sebelum diemparkan pada kelajuan 3000 rpm selama 10 minit untuk bertindakbalas. Kemudian 2.5 ml supernatan diambil dan ditambahkan dengan 2.5 ml air suling dan 0.5 ml $FeCl_3$ (0.1%). Larutan divorteks sebelum dibaca penyerapannya pada jarak gelombang 700 nm menggunakan spektrofotometer (Model JENWAY 6100).

Ujian Terhadap Kesan Ekstrak Tumbuhan Dalam Burger Ayam

Bagi mengetahui kesan ekstrak-ekstrak tumbuhan ke atas mutu simpanan burger ayam, sebanyak tujuh formulasi ayam tua kajian telah

dibuat termasuk satu sampel kawalan ayam muda. Sampel kajian adalah seperti berikut: Kawalan Ayam Muda (K1), Kawalan Ayam Tua (K2), 200 ppm BHT (A1), 200 ppm BHA (A2), 400 ppm ekstrak air ulam raja (E1), 200 ppm ekstrak air daun kesum (E2) dan 1000 ppm ekstrak air daun kari (E3). Penambahan ekstrak tumbuhan ke dalam produk adalah berdasarkan kepada ujian kuasa penurunan ferum (III) yang setanding dengan 200 ppm BHA.

Ujian Tiobarbiturik (TBA) dibuat merujuk kepada kaedah yang dibuat oleh Tarladgis *et al.* (1960) dengan sedikit pengubahsuaian oleh Rhee (1978) manakala Penentuan Nilai Peroksida (PV) dengan kaedah PORIM (1995).

Analisis Statistik

Semua data yang diperolehi telah dianalisis dengan menggunakan program sistem SAS (Statistical Analysis System, 1995) versi 6.21 untuk ujian ANOVA dan ujian DUNCAN.

3. Hasil Dan Pembahasan

Hasil Ekstrak Sampel

Berdasarkan Jadual 1, peratus hasil dapatan ekstrak daun kari bagi pelarut etanol dan metanol adalah paling tinggi berbanding sampel lain, iaitu masing-masing pada 2.03% dan 1.65%. Bagi pelarut air pula, daun selom menghasilkan peratus ekstrak tertinggi iaitu 5.19%. Ulam raja menghasilkan ekstrak terendah bagi pelarut air iaitu sebanyak 1.93%. Secara keseluruhannya pelarut air dapat menghasilkan ekstrak tertinggi berbanding

pelarut etanol dan metanol. Peratus hasil dapatan ekstrak yang sama bagi pelarut yang berbeza dipengaruhi oleh kepolaran pelarut yang berbeza.

Kandungan Komponen Fenolik Jumlah

Pengukuran kandungan komponen fenolik jumlah adalah dengan mengira kuantiti jumlah kepekatan kumpulan hidroksil polifenol yang hadir dalam ekstrak asai (Waterman dan Mole, 1994). Berpandukan Jadual 2, didapati daun kari dengan pelarut etanol dan metanol mengandungi komponen fenolik jumlah tertinggi ($P < 0.05$) dengan nilai masing-masing pada 42.31 dan 38.60 mg TAE/100 g berat basah sampel berbanding tumbuhan lain yang dikaji. Ini diikuti oleh ulam raja dengan ekstrak etanol dan metanol masing-masing bernilai 20.91 dan 18.83 mg TAE/100 g berat basah sampel. Ekstrak air kesum menunjukkan kandungan komponen fenolik jumlah tertinggi iaitu 44.35 mg TAE/100 g berat basah sampel. Ini diikuti dengan daun kari, ulam raja, selom dan pegaga. Ekstrak air pegaga mengandungi komponen fenolik jumlah terendah iaitu 3.72 mg TAE/100 g berat basah sampel. Komponen fenolik yang tertinggi bagi ketiga-tiga pelarut adalah daun kari diikuti oleh kesum dan ulam raja.

Ujian Kuasa Penurunan Ferum (III) (FRAP)

Ujian ini dilakukan untuk mengukur perubahan Fe (III) kepada Fe (II) dengan kehadiran sampel kajian. Kemampuan sesuatu komponen menurunkan Fe (III) kepada Fe (II) mungkin

Jadual 1. Peratus Hasil Dapatan Ekstrak Sampel Menggunakan 3 Jenis Pelarut (Etanol, Metanol dan Air)

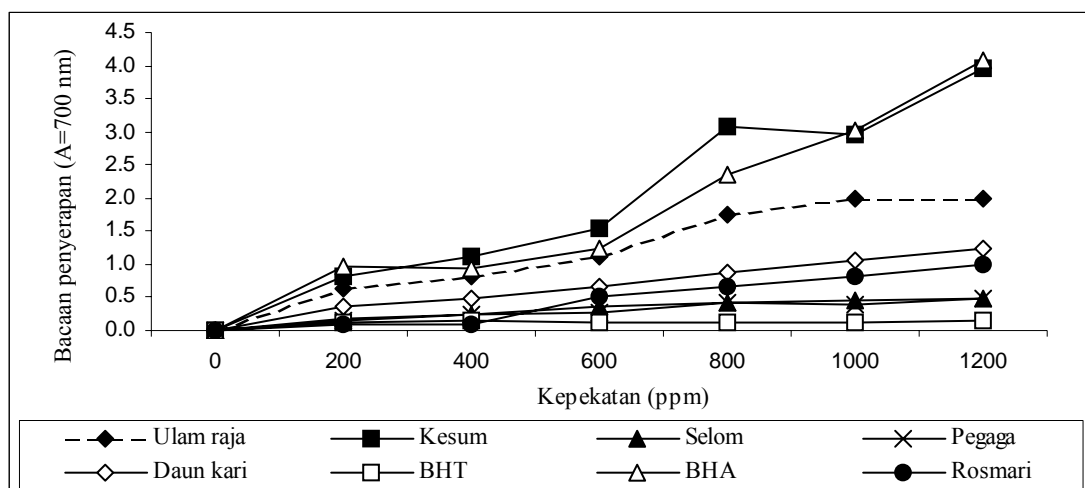
Sampel	Peratus Hasil Dapatan Ekstrak Sampel		
	Etanol	Metanol	Air
Daun Kari	2.03 ± 1.43	1.65 ± 0.47	2.95 ± 0.71
Kesum	0.59 ± 0.15	0.80 ± 0.37	4.01 ± 0.60
Ulam raja	0.70 ± 0.35	1.13 ± 0.41	1.93 ± 1.00
Pegaga	0.40 ± 0.12	0.71 ± 0.03	2.22 ± 0.78
Selom	0.42 ± 0.06	0.66 ± 0.14	5.19 ± 1.65

Data analisis diperolehi daripada eksperimen secara triplikat

Jadual 2. Kandungan Komponen Fenolik Jumlah Dalam Tumbuhan Kajian

Sampel	Kandungan Fenolik Jumlah (mg TAE/100g berat basah sampel)		
	Etanol	Metanol	Air
Daun Kari	42.31 ± 30.04	38.60 ± 8.26	24.62 ± 6.74
Ulam raja	20.91 ± 12.00	18.83 ± 6.35	21.41 ± 11.90
Kesum	9.97 ± 1.84	16.73 ± 4.94	44.35 ± 2.13
Pegaga	1.56 ± 0.29	7.79 ± 0.74	3.72 ± 0.67
Selom	3.74 ± 1.84	7.41 ± 0.78	19.96 ± 10.11

Data analisis diperolehi daripada eksperimen secara triplikat



Rajah 1. Hasil Ujian FRAP Bagi Ekstrak Sampel Air

berpotensi mempunyai aktiviti antioksidasi. Ini kerana bahan antioksidasi merupakan agen penurun yang menyahaktifkan proses pengoksidaan dan dikenali sebagai tindak balas redoks (Benzie dan Strain, 1996). Rajah 1 menunjukkan hasil ujian FRAP bagi ekstrak sampel air tumbuhan tersebut. Pada kepekatan 200 ppm, didapati ekstrak air kesum serta ulam raja memperlihatkan kuasa penurunan ferum (III) yang setanding dengan BHA. Bacaan penyerapan bagi ekstrak air kesum, ulam raja dan BHA pada kepekatan 200 ppm masing-masing bernilai 0.809, 0.773, 0.648 dan 0.966. Ekstrak air selom memperlihatkan bacaan penyerapan paling rendah (0.174) dan tidak berbeza secara signifikan dengan pegaga, dan BHT. Pada kepekatan 1200 ppm ekstrak air kesum memperlihatkan bacaan penyerapan 3.951 manakala BHA ialah 4.074 ($P > 0.05$). Ekstrak air sampel lain menunjukkan aktiviti kuasa penurunan ferum (III) yang lebih baik daripada BHT ($P < 0.05$).

Analisis Nilai Peroksida (PV)

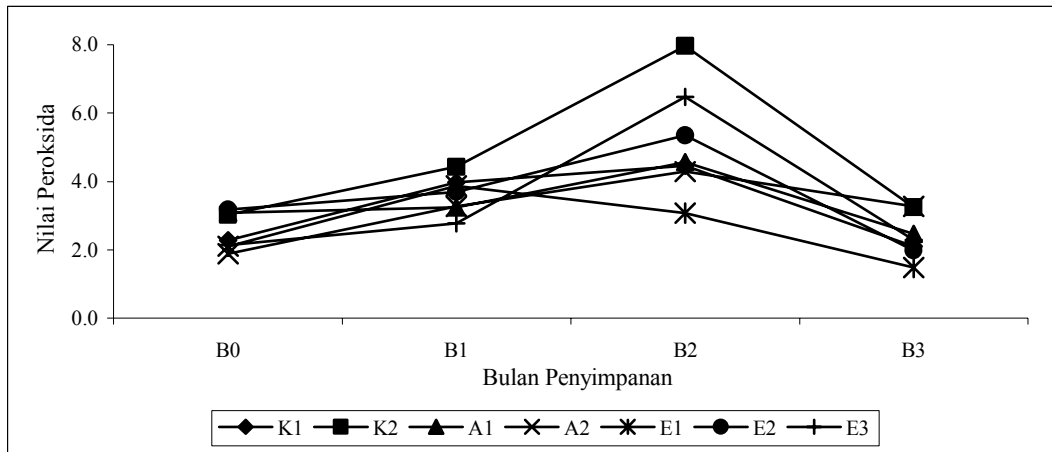
Analisis ini dijalankan untuk menilai produk pengoksidaan primer (peroksida dan hidroperoksida) semasa pengoksidaan lipid. Rajah 2 dan Rajah 3 menunjukkan nilai peroksida bagi keseluruhan sampel mentah dan masak meningkat sepanjang tempoh 2 bulan penyimpanan sejukbeku tetapi menurun pada bulan ketiga penyimpanan. Ini mungkin kerana, analisis PV hanya sesuai dan sensitif untuk menilai tahap permulaan pengoksidaan (Hudson, 1989). Sampel kawalan ayam tua menunjukkan nilai peroksida yang paling tinggi bagi sampel mentah dan masak. Sampel

ekstrak 400 ppm ulam raja menunjukkan nilai peroksida yang paling rendah ($P < 0.05$) bagi sampel mentah, sementara nilai peroksida bagi sampel 200 ppm BHT menunjukkan nilai PV yang paling rendah ($P < 0.05$) bagi sampel masak pada tiga bulan penyimpanan sejukbeku. Nilai PV sampel masak adalah lebih rendah berbanding nilai PV sampel mentah. Kemungkinan semasa masak, komponen-komponen peroksida telah meruap. Walaubagaimanapun, nilai peroksida bagi sampel kajian tidak melebihi 8.0 militar/kg sampel untuk mana-mana perlakuan mentah dan masak. Komponen peroksida tidak bertanggungjawab dalam ketengikan tetapi bertindak sebagai pelopor dalam perkembangan proses ketengikan dan pengoksidaan seterusnya (Padda, 1987).

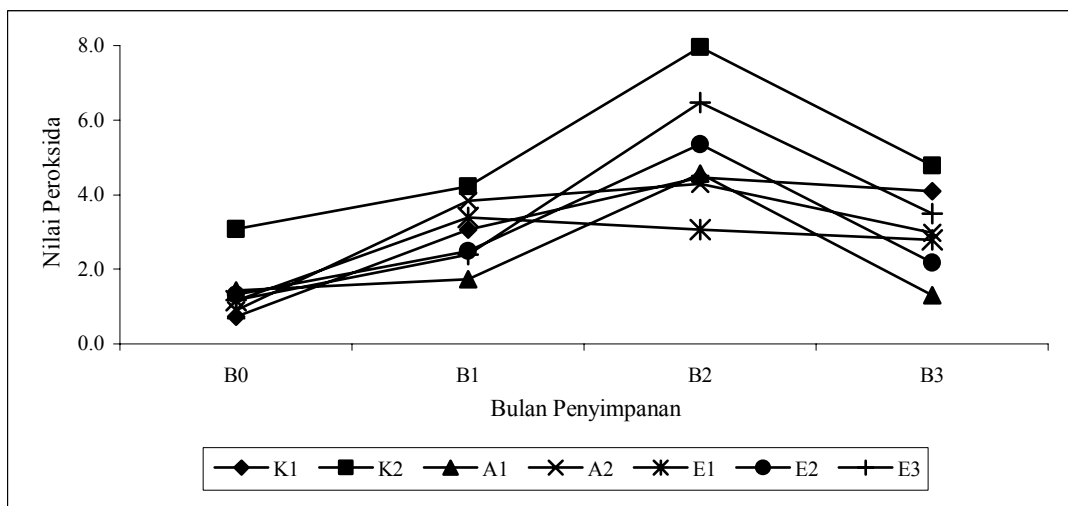
Analisis Nilai Asid Tiobarbiturik (TBA)

Malonaldehid merupakan hasil produk sekunder lipid (Ahn *et al.*, 2002). Analisis TBA merupakan analisis untuk mengukur produk-produk pengoksidaan sekunder (Shahidi dan Wanasundra, 1998). Rajah 4 menunjukkan hasil analisis TBA pada sampel mentah sepanjang 3 bulan penyimpanan. Pada awal penyimpanan nilai TBA bagi semua sampel adalah antara 0.566 – 0.811 dan tidak berbeza secara signifikan ($P < 0.05$). Perubahan yang ketara dilihat pada bulan kedua penyimpanan di mana sampel kawalan ayam tua menunjukkan nilai TBA yang paling tinggi (1.159) sehingga akhir penyimpanan.

Pada akhir penyimpanan, sampel kawalan ayam tua menunjukkan nilai TBA yang paling tinggi (1.880) manakala sampel yang diberi



Rajah 2. Hasil Analisis PV Sampel Mentah Sepanjang 3 Bulan Penyimpanan



Rajah 3. Hasil Analisis PV Sampel Masak Sepanjang 3 Bulan Penyimpanan

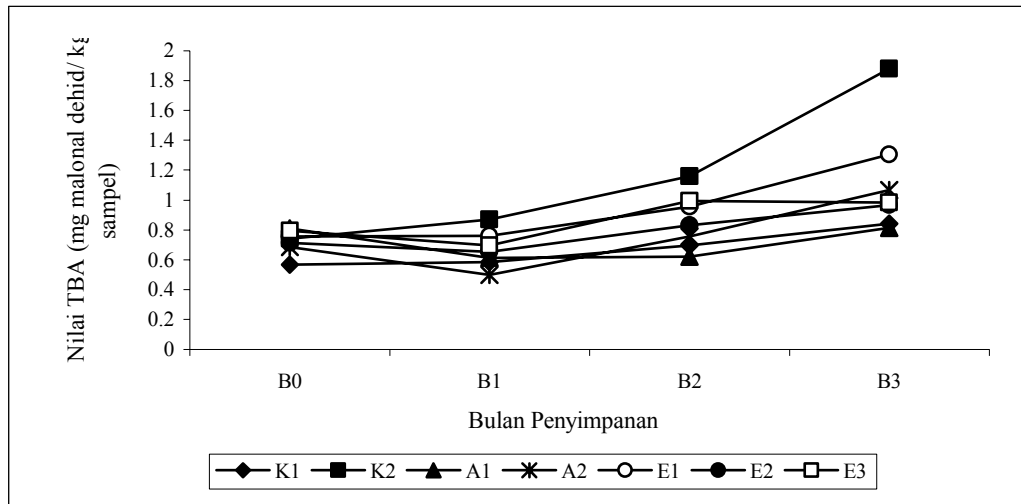
perlakuan 200 ppm BHT menunjukkan nilai TBA yang terendah (0.812). Walaubagaimanapun, sampel mentah kawalan ayam muda (0.853), ekstrak daun kesum (0.967) dan 1000 ppm ekstrak daun kari (0.983) tidak berbeza secara signifikan pada akhir penyimpanan dengan 200 ppm BHT. Peratus perencatan pengoksidaan lipid bagi 200 ppm BHT, 200 ppm BHA, 400 ppm ulam raja, 200 ppm daun kesum dan 1000 ppm daun kari masing-masing ialah 38.58, 35.3, 18.69, 31.96 dan 25.42 peratus. Peratus perencatan pengoksidaan lipid bagi kawalan ayam muda ialah 41.98 peratus.

Nilai TBA dalam Rajah 5 bagi sampel masak burger kajian didapati lebih tinggi berbanding sampel burger mentah kajian kecuali pada sampel kawalan ayam tua. Nilai TBA yang paling rendah pada tiga bulan penyimpanan sejukbeku adalah pada sampel yang

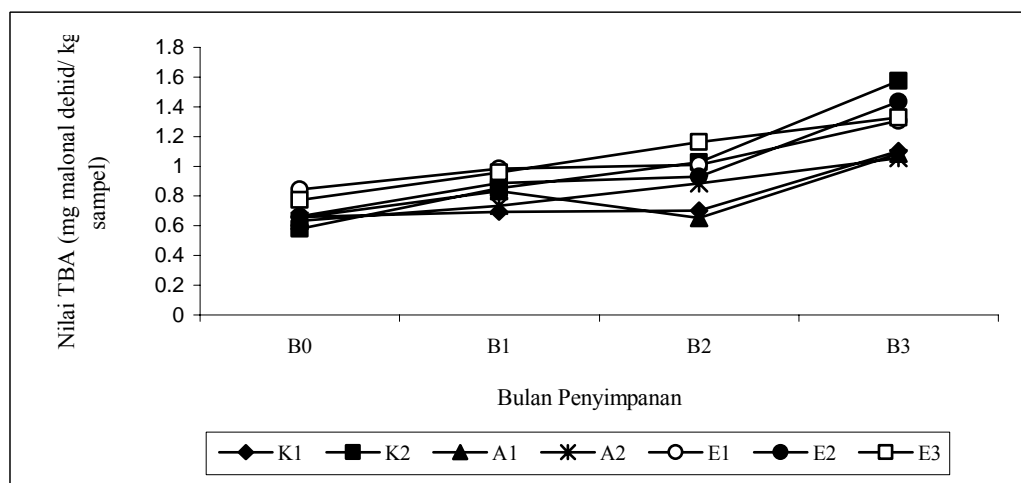
ditambahkan dengan 200 ppm BHA (1.057) dan tidak berbeza secara signifikan dengan kawalan ayam muda, 200 ppm BHT dan 400 ppm ulam raja. Komponen-komponen sekunder yang terhasil mungkin meruap semasa proses pemasakan dilakukan.

4. Kesimpulan

Analisis kandungan fenolik jumlah yang telah dilakukan terhadap tumbuhan menggunakan 3 jenis pelarut menunjukkan tumbuhan ulam raja, kesum dan daun kari mempunyai komponen fenolik jumlah yang tinggi. Dalam ujian kuasa penurunan ferum (III), semua ekstrak tumbuhan dapat menurunkan ferum (III) tetapi ekstrak air sampel didapati paling baik. Daripada ujian-ujian pengoksidaan, didapati nilai PV semua sampel meningkat pada bulan 0 sehingga bulan 2 penyimpanan sejukbeku tetapi menurun pada bulan 3 penyimpanan. Sampel burger dengan 400 ppm ekstrak ulam raja



Rajah 4. Hasil Analisis TBA Sampel Mentah Sepanjang 3 Bulan Penyimpanan



Rajah 5. Hasil Analisis TBA Sampel Masak Sepanjang 3 Bulan Penyimpanan

menunjukkan nilai PV yang paling rendah bagi sampel mentah tetapi sampel burger dengan 200 ppm BHT menunjukkan nilai PV yang paling rendah apabila dimasak. Nilai TBA menunjukkan peningkatan nilai malonaldehid sepanjang tempoh tiga bulan penyimpanan sejukbeku bagi kesemua sampel. Sampel burger dengan 200 ppm BHT menunjukkan nilai TBA yang paling rendah bagi sampel mentah. Bagi sampel masak nilai TBA sampel burger dengan 200 ppm BHA adalah yang terendah pada bulan 3 penyimpanan sejukbeku.

5. Ucapan Terimakasih

Penghargaan kepada UKM kerana hadiah Skim Pasca Siswazah yang telah membiayai projek tersebut.

6. Daftar Pustaka

Ahn J., Grun I. U., Fernando L. N. (2002). Antioxidant Properties of Natural Plant Extracts

Containing Polyphenolic Compounds in Cooked Ground Beef, *J. Food Chem. Toxicol.* **67**(4), 1364-1369.

Al-Jalay B., Blank G., McConnel B., Al-Khayat M. (1987). Antioxidant Activity of Selected Spices Used in Fermented Meat Sausages, *J. Food Prot.* **50**, 25-27.

Auborg S. P. (1999). Lipid Damage Detection During the Frozen Storage of An Underutilized Fish Species, *Food Res. Intern.* **32**, 497-560.

Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power" the FRAP, *Assay. Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Chen C.H., Pearson A.M., Gray J.I. (1992). Effects of Synthetic Antioxidants (BHA, BHT, PG) on the Mutagenicity of IQ-like Compounds. *Food Chem.* **43**, 177-183.

- El-Alim S.S.L.A., Lugasi A., Hovari J., Dworschak E. (1999). Culinary Herbs Inhibit Lipid Oxidation in Raw and Cooked Minced Meat Patties During Storage, *J. Sci. Food Agric.* **79**, 277-285.
- Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., Aruoma O.I. (1995). Free Radicals and Antioxidants in Food An *in Vivo*: What They Do and How They Work, *Crit. Rev. Food Sci. and Nut.* **35**, 7-20.
- Hudson B.J.F. (1989). Evaluation of Oxidative Rancidity Techniques. Dalam. Allen J.C., & Hamilton R.J., (pnyt.). *Rancidity in Foods*. Elsevier Applied Science, London.
- Madsen H. L., Bertelsen G. (1995). Spices As Review. *Trends in Food Sci. Tech.* **6**, 271-277.
- Nakatani N. (1992). *Natural Antioxidant from Spices*. American Chemical Society., Marcel Dekker, Inc., Washington DC.
- Oyaizu M. (1986). Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Pruducts of Browning Reaction Prepared from Glucoamine. *Jap. J. Nutr.* **44**, 307-315.
- Padda G.S. (1987). Oxidative Discoloration and Rancidity in Meat – A Review. *Indian Foodpacker.* **41**(6), 31.
- PORIM (1995). Methods of Test for Palm Oil and Palm Oil Products. Dalam Siew, W.L., Tang, T. S., Tan, Y. A. (ed.) *PORIM Test Methods*. Vol. 1., Ministry of Primary Industries, Malaysia.
- Rhee K.S. (1978). Minimazation of Further Lipid Oxidation in the Distillation 2 – Thobarbituric Acid Test of Fish and Meat. *J. Food Sci.* **43**, 1776-1781.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavanoids. *Free Radical Res.* **22**, 375-383.
- Shahidi, F., Wanasundra, U.N. (1998). Methods for Measuring Oxidative Rancidity of Fats and Oils. Dalam Akoh, C.C., Min, D.B. (ed.) *Food Lipids: Chemistry, Nutrtrion and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.
- Sherwin E.R. (1990). Antioxidant Dalam Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (ed.) *Food Additives*, New York.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic and Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- St. Angelo A.J., Verticolli J.R., Legendre M.G., Vinnett C.H., Kuan J. W., James C. Jr., Dupuy H.P. (1987). Chemical and Instrumental Analyses of Warmed – Over Flavor in Beef. *J. Food Sci.* **52**(5), 1163-1168.
- Sun B.X., Fukuhara M. (1997). Effect of co-Administration of BHT, BHA and Flavanoids on the Activation of Mutagens and Drug-Metabolizing Enzymes in Mice. *Toxicol.* **122**, 61-72.
- Tarladgis B.G., Watts,B.M., Younathan M.T., Dugan, L. (1960). A Distillation Method for the Quantitative Determination of Malonaldehyde in Rancid Foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **37**, 44-48.
- Yagi,K., Inagaki T., Sasaguri Y., Nakano R., Narasimha T. (1987). Formation of Lipid Laden Cells From Cultured Aortic Smooth Muscles Cells and Macrophages by Linoleic Acid Hydroperoxide and Low Density Lipo-Protein. *J. Clin. Biochem. Nutri.* **3**, 87-94.
- Waterman P.G., Mole S. (1994). *Analysis of Phenolic Plants Metabolites*. Oxford Blackwell Scientific Publicaions, London.



Kajian Jangka Hayat Dan Penerimaan Produk Bakteri Jenis *Pre-proven*, Pra-bakar Serta *Thaw And Serve*

Norrakiah Abdullah Sani, Abdul Salam Babji, Nurakmal Othman, Norazam Hassan, Norhayati Abdullah dan Nor Anisah Abdullah

Program Sains Makanan, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
Bangi, Selangor, Malaysia.
E.mail: norra@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Kajian ini dijalankan bagi menentukan kualiti mikrobiologi produk bakeri jenis *pre-proven*, (*Strudel Apple*, *Twist Vanilla Chocolate* dan *Hazelnut Whirl*), *pra-bakar* (*Soft Bun*, *Foccacio Bun-eggwash*, *Multigrain Roll* dan *Wholemeal Roll*) dan *thaw and serve* (*Laugen Sandwich* dan *Swiss Sunday Bread*). Selain itu penentuan nilai aktiviti air (A_w) dan pH serta tahap penerimaan produk bakeri mengikut jantina turut dijalankan. Kesemua sampel produk bakeri ini telah disimpan pada suhu sejukbeku (-22°C) bagi tempoh penyimpanan 8 hingga 12 bulan bergantung kepada jenis produk iaitu 8 bulan untuk jenis *pre-proven* dan 12 bulan untuk jenis *pra-bakar* dan *thaw and serve*. Sampel telah dianalisis pada setiap bulan penyimpanan. Analisis mikrobiologi yang dijalankan adalah hitungan piring jumlah (TPC), kiraan yis dan kulat, penentuan *Bacillus cereus* dan *Bacillus spp.*, Koliform, Koliform Najis, *Escherichia coli* dan *Salmonella spp.* Hasil kajian menunjukkan bahawa penyimpanan secara sejukbeku produk bakeri dapat merencat atau mengawal pertumbuhan bakteria mesofilik, yis dan kulat serta Koliform. Ketidakhadiran Koliform Najis, *E. coli*, *Salmonella spp.* serta *B. cereus* dan *Bacillus spp.* dalam kesemua sampel produk bakeri menunjukkan tahap kebersihan dan sanitasi yang baik dalam keseluruhan proses penghasilan produk bakeri ini. Julat nilai pH bagi produk bakeri kajian ialah antara 4.7 hingga 6.5 dan julat nilai A_w ialah antara 0.91 hingga 0.96. Berdasarkan soal selidik didapati pelajar perempuan lebih gemar memakan pelbagai jenis produk bakeri berbanding pelajar lelaki tetapi tabiat pemakanan produk bakeri antara kedua-dua jantina mempunyai banyak persamaan. Tahap pengetahuan pelajar perempuan berkaitan produk bakeri adalah lebih baik berbanding pelajar lelaki tetapi pengetahuan tentang produk bakeri sejukbeku secara keseluruhannya adalah masih rendah.

Kata kunci: Produk bakeri *pre-proven*, Produk bakeri *pra-bakar*, Produk bakeri *thaw and serve*, Kualiti mikrobiologi, Penyimpanan sejukbeku.

1. Pendahuluan

Pada tahun 2003, industri bakeri di Malaysia telah mencatatkan peningkatan sebanyak 3.4% berbanding tahun sebelumnya dengan nilai jualan mencecah hampir RM1.953 juta. Peningkatan jualan pada tahun 2003 adalah lebih memberangsangkan berbanding tahun 2002 yang mencatatkan peningkatan kepada RM65 juta berbanding tahun sebelumnya. Perkembangan positif ini adalah berdasarkan

kepada 2 faktor utama. Faktor pertama ialah peningkatan tahap kesedaran di kalangan anggota masyarakat terhadap kepentingan kesihatan (Anon, 2004). Adalah dijangkakan tren kesihatan akan menjadi pendorong utama kepada perkembangan industri bakeri di Malaysia, terutamanya produk bakeri dan bijirin sarapan. Pemilihan produk bakeri dan bijirin sarapan sebagai hidangan sarapan pagi dapat menggantikan menu sarapan tempatan

yang kebiasaannya lebih berminyak, tinggi kandungan lemak dan kolesterol.

Faktor kedua ialah perkembangan dan kepelbagaian jenis poduk bakeri yang boleh diperolehi di pasaran yang mempamerkan maklumat berkaitan kesihatan sebagai strategi utama pasarannya (Anon, 2004). Roti dan produk bakeri lain merupakan produk dalam bentuk sedia dimakan. Penghasilan produk bakeri melibatkan lima peringkat yang utama iaitu penyediaan bahan-bahan mentah, pembentukan doh, pemprosesan doh dan fermentasi, pembakaran dan pengawetan. Produk bakeri segar kebiasaannya mempunyai jangka hayat yang singkat. Kualiti produk bakeri akan merosot dengan cepat selepas dikeluarkan dari ketuhar disebabkan oleh kehilangan kesegaran dan kerangupan.

Kerosakan produk bakeri yang disebabkan oleh kulat merupakan masalah serius dan penggunaan bahan pengawet dianggap cara terbaik untuk menangani masalah ini bagi menjamin keselamatan makanan (Suhr dan Nielsen, 2004). Peningkatan ilmu pengetahuan, kemajuan teknologi dan amalan gaya hidup sihat menyebabkan lebih ramai individu perihatin terhadap apa yang mereka makan. Walaubagaimanapun, pengguna hari ini tidak begitu gemar penggunaan bahan tambah sebagai agen pengawet dan terdapat desakan supaya agen pengawet yang digunakan dalam produk bakeri dikurangkan (Membre *et al.*, 2001). Penyelidikan ini dijalankan berdasarkan objektif di bawah iaitu:

1. Menentukan kualiti mikrobiologi, aktiviti air (A_w) dan pH bagi produk bakeri jenis *preproven*, *prabakar* dan *thaw and serve*,
2. Menentukan tahap penerimaan produk

bakeri mengikut jantina.

2. Percobaan

Sampel kajian

Sampel kajian telah dibekalkan oleh Syarikat Hiestand Malaysia Sdn. Bhd. dan produk bakeri yang telah disampel disimpan di stor simpanan sejukbeku (-22°C). Produk bakeri dibawa ke makmal analisis makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) untuk dianalisis pada setiap bulan penyimpanannya. Tempoh kajian adalah bergantung kepada jenis produk iaitu 8 bulan bagi produk *pre-proven* dan 12 bulan bagi produk *pra-bakar* serta *thaw and serve*. Jadual 1 menunjukkan jenis produk bakeri yang dikaji di bawah kategori produk bakeri yang berbeza.

Analisis Mikrobiologi

Analisis mikrobiologi adalah berdasarkan kepada kaedah Roberts *et al.* (1995) dan *Merck Microbiological Manual* (2000). Sebanyak 10 gram sampel dihomogenkan bersama 90 ml larutan *Maximum Recovery Diluent* (MRD) selama 30 saat. Pencairan bersiri dilakukan sehingga 10^{-6} . Penentuan jumlah mikroba berdaya hidup (mesofilik) ditentukan dengan menggunakan agar *Plate Count* (PCA) dan piring dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Agar VRBA digunakan untuk ujian jangkakan kehadiran koliform, koliform najis dan *Escherichia coli*. Koloni jangkakan yang terhasil dikenalpasti dengan menggunakan 1% air pepton dan kaldu Brilliant Green Bile Broth (BGBB).

Pengiraan yis dan kulat dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 0.1ml pencairan sampel ke atas media *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC). Piring dieramkan pada suhu 25°C selama 3 hingga 5 hari. Penentuan *Salmonella* spp. dimulakan dengan langkah pengkayaan dengan menggunakan

Jadual 1. Sampel Produk Bakeri Yang Dikaji Di Bawah Kategori Yang Berbeza

Kategori	Jenis	Nama produk
<i>Pre-proven</i>	<i>Swiss Danish Pastry</i>	<i>Hazelnut Whirl</i> (HW)
		<i>Strudel Apple</i> (SA)
		<i>Twist Vanilla Chocolate</i> (TVC)
Pra-bakar	<i>Bun</i>	<i>Focaccio Bun Egg Wash</i> (FBE)
		<i>Soft Bun</i> (SB)
		<i>Multigrain Roll</i> (MGR)
<i>Thaw and Serve</i>	<i>Bread Loaves</i>	<i>Wholemeal Roll</i> (WMR)
		<i>Laugen Sandwich</i> (LS)
		<i>Swiss Sunday Bread</i> (SSB)

Kaldu Asas *Salmosyst*[®] (SBB) yang dieramkan pada 35°C selama 22 jam. Pencoretan dilakukan pada media selektif *Xylose Lysine Desoxycholate* (XLD) dan agar *Salmonella Shigella* (SSA) (37°C, 24 jam). Koloni tipikal diinokulatkan ke agar condong *Triple Sugar Iron* (TSI), agar condong Urea dan agar *Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose* (EMB) (35°C, 24 jam) bagi ujian biokimia kehadiran *Salmonella* spp. Kehadiran *Bacillus cereus* dan *Bacillus* spp. ditentukan dengan menggunakan agar *Mannitol Egg-Yolk-Polymyxine* (MYP) yang dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang terhasil telah diuji secara biokimia (katalase, mannitol, glukosa, nitrat dan *Voges proskeur*).

Analisis Fiziko-kimia

Penentuan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (*Ion Meter Fisher, Accument Model 230A*). Sebanyak 5 gram sampel dihomogenkan bersama 50 ml air suling. Penentuan nilai A_w pula dilakukan dengan menggunakan Meter Aktiviti Air (Model: AQUA LAB CX-2).

Kajian Pengguna

Kajian pengguna telah melibatkan seramai 100 orang mahasiswa dan mahasiswi UKM dari pelbagai kaum yang berumur di antara 19 hingga 30 tahun. Pemilihan responden adalah berdasarkan kepada faktor penghad masa dalam menjalani kehidupan di kampus serta tren kehidupan golongan muda dan terpelajar yang sentiasa sibuk. Secara tidak langsung soal selidik ini dapat memberikan pendedahan dan pemahaman kepada golongan pelajar akan kepelbagaian produk bakeri di pasaran.

Analisis Statistik

Kesemua data ujian yang diperolehi dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Analysis System* (SAS) versi window 6.12 bagi ujian ANOVA dan Duncan. Nilai perbezaan signifikan adalah berdasarkan aras keyakinan 95% ($p < 0.05$).

3. Hasil dan Pembahasan

Secara umum, melalui keputusan mikrobiologi, didapati bahawa penyimpanan sejukbeku bagi produk bakeri berkeupayaan untuk merencat atau mengawal pertumbuhan mikroorganisma perosak dan patogen. Jadual 2 menunjukkan keputusan bagi hitungan piring jumlah mesofil bagi produk *pre-proven* serta pra-bakar dan *thaw and serve*. Penurunan beban bakteria

mesofil bagi produk *pre-proven* adalah signifikan ($p < 0.05$) disepanjang tempoh penyimpanan sejukbeku kecuali bagi produk *Twist Vanilla Chocolate* (TVC). Secara keseluruhan purata penurunan nilai TPC mesofil bagi kesemua produk *pre-proven* selepas 8 bulan penyimpanan adalah sebanyak 10^2 cfu/g iaitu daripada 10^7 cfu/g kepada 10^5 cfu/g. Walaubagaimanapun, produk *pre-proven* yang berinti mempunyai nilai TPC yang lebih tinggi berbanding produk bakeri tanpa berinti. Ini kerana pertumbuhan bakteria mesofilik ini berkemungkinan dipengaruhi oleh jenis kandungan inti. Daripada Jadual 2 didapati bahawa pada bulan 0, purata nilai TPC mesofil adalah 7.4 log cfu/g dan nilai ini menurun hingga 5.3 log cfu/g pada bulan ke 8.

Nilai TPC yang tinggi ini berjaya diminimakan dalam kajian ini dengan penyejukbekuan doh pada suhu -22°C. Oleh kerana suhu untuk menaikkan doh (28-30°C) berada dalam julat optimum bagi pertumbuhan bakteria mesofilik (30-35°C), maka keadaan ini membolehkan pertumbuhan bakteria di dalam produk tersebut (Che Omar *et al.*, 1996). Doh *pre-proven* terus disejukbekukan selepas proses penaikan doh tanpa sebarang perlakuan haba yang tinggi. Nilai TPC yang tinggi dalam doh ini dapat diminimumkan lagi melalui proses pembakaran. Proses pembakaran doh mentah dapat mengurangkan bilangan mikroba dari 6.0×10^7 cfu/g kepada 1.7×10^2 cfu/g (Viljoen dan Lues, 1993).

Berlainan pula bagi produk pra-bakar dan *thaw and serve*, hitungan piring jumlah mesofil menunjukkan pola penurunan yang kecil pada awal bulan penyimpanan dan kekal konsisten pada nilai kurang daripada 2.0 log cfu/g selepas 6 bulan penyimpanan. Penurunan yang signifikan dapat diperhatikan melalui 4 bulan pertama penyimpanan (Jadual 2). Secara purata, pertumbuhan bakteria mesofil pada bulan 0 ialah 2.4 log cfu/g dan menurun kepada 2.0 cfu/g pada bulan ke 4 penyimpanan. Selepas 6 bulan penyimpanan, beban TPC menjadi konsisten pada 2.0 log cfu/g. Merujuk kepada kriteria mikrobiologi nilai ini berada di dalam julat yang memuaskan iaitu 10^1 hingga 10^3 cfu/g (ICMSF, 1990). Penurunan mikroorganisma di awal kajian adalah disumbangkan oleh perlakuan haba semasa pembakaran produk bakeri tersebut.

Jadual 3. Kiraan Yis dan Kulat (log cfu/g) Produk *Pre-proven*, Produk Pra-bakar serta *Thaw and Serve* Semasa Penyimpanan Sejukbeku (-22°C)

Sampel	Tempoh Penyimpanan (bulan)					
	0	1	2	3	4	6
SA	7.405 ^{ab} ±0.06	7.105 ^{aA} ±0.09	6.485 ^{bA} ±0.01	6.280 ^{bA} ±0.04	6.160 ^{bb} ±0.03	5.146 ^{cA} ±0.11
HW	7.435 ^{aA} ±0.09	7.030 ^{bb} ±0.08	6.445 ^{cc} ±0.02	6.265 ^{dB} ±0.01	6.205 ^{dA} ±0.02	4.855 ^{eb} ±0.00
TVC	7.350 ^{ac} ±0.07	6.985 ^{bc} ±0.04	6.460 ^{cb} ±0.07	6.215 ^{dC} ±0.08	6.120 ^{dC} ±0.03	4.910 ^{eb} ±0.05
SB	2.35 ^{aA} ±0.06	2.27 ^{bA} ±0.17	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
FBE	2.32 ^{aA} ±0.11	2.23 ^{bA} ±0.11	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
MGR	2.35 ^{aA} ±0.06	2.27 ^{bA} ±0.04	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
WMR	2.32 ^{aA} ±0.11	2.27 ^{abA} ±0.17	2.23 ^{bcA} ±0.11	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
LS	2.39 ^{aA} ±0.12	2.23 ^{bA} ±0.11	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
SSB	2.30 ^{aA} ±0.00	2.27 ^{abA} ±0.04	2.23 ^{cbA} ±0.11	2.20 ^{bA} ±0.06	2.08 ^{dA} ±0.11	<2.00 ^{dA} ±0.00

Sampel	Tempoh Penyimpanan (bulan)					
	7	8	9	10	11	12
SA	4.781 ^{cdA} ±0.14	4.658 ^{dA} ±0.45	-	-	-	-
HW	4.764 ^{efA} ±0.05	4.710 ^{fA} ±0.15	-	-	-	-
TVC	4.900 ^{cA} ±0.22	4.779 ^{eA} ±0.03	-	-	-	-
SB	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
FBE	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
MGR	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
WMR	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
LS	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
SSB	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00

^{a-f} Abjad yang sama pada baris yang sama menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p>0.05$)

^{A-C} Abjad yang sama pada lajur yang sama menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p>0.05$)

± Sisihan piawai bagi 2 persampelan ($n = 2$)

Keputusan ujian bagi hitungan jumlah yis dan kulat (Jadual 3) juga menunjukkan pola penurunan bagi semua jenis produk bakeri yang dikaji. Kandungan yis dan kulat dalam produk *pre-proven* menunjukkan penurunan sebanyak 10^2 cfu/g di awal bulan hingga bulan ke 8 dengan nilai purata sebanyak 7.0 log cfu/g dan 4.8 log cfu/g masing-masing. ICMSF (1998) telah menetapkan bahawa kiraan yis dan kulat yang kurang dari 10^5 cfu/g adalah kategori bakeri yang memuaskan bagi doh mentah. Berlainan pula bagi produk pra-bakar serta *thaw and serve*, nilai kiraan yis dan kulat menunjukkan pola mendatar sepanjang tempoh penyimpanan sejuk beku. Beban mikrob kekal konsisten pada nilai kurang daripada 2.0 log cfu/g selepas 6 bulan penyimpanan. Walaubagaimanapun, nilai beban mikrob pada bulan 0 hingga 4 adalah lebih tinggi berbanding bulan ke 6 hingga ke 12.

Keputusan bagi penentuan kehadiran koliform, koliform najis dan *E. coli* di sepanjang kajian penyimpanan sejuk beku menunjukkan bahawa hanya produk *pre-proven* sahaja yang didapati positif bagi kehadiran koliform. Namun begitu,

kehadiran koliform hanya dapat dikesan pada 3 hingga 4 bulan di awal penyimpanan sejuk beku. Oleh itu, didapati penyimpanan sejuk beku berkeupayaan untuk mengawal pertumbuhan koliform, koliform najis dan *E. coli*. Kehadiran koliform di dalam produk ini berkemungkinan besar berpunca dari masalah kualiti air yang rendah berdasarkan kajian mengenai kualiti air di kilang tersebut (Faizah, 2004).

Kajian ini memperolehi keputusan negatif bagi kehadiran *E. coli*, koliform najis, *Salmonella* spp. serta *Bacillus cereus* dan *Bacillus* spp. dalam semua sampel produk bakeri kajian di sepanjang penyimpanan sejuk beku. Ketidakhadiran mikroorganisma ini menunjukkan tahap kebersihan dan sanitasi yang baik dalam keseluruhan proses penghasilan produk bakeri di premis ini.

Keputusan bagi nilai pH pula mendapati setiap jenis produk bakeri mempunyai nilai pH yang berbeza-beza. Secara purata, nilai pH bagi produk bakeri ini ialah di antara 4.7 hingga 6.5. Sampel yang mempunyai inti seperti epal, kismis dan asid sitrik mempunyai nilai pH yang

Jadual 3. Kiraan Yis dan Kulat (log cfu/g) Produk *Pre-proven*, Produk Pra-bakar serta *Thaw and Serve* Semasa Penyimpanan Sejukbeku (-22°C)

Sampel	Tempoh Penyimpanan (bulan)					
	0	1	2	3	4	6
SA	7.405 ^{aB} ±0.06	7.105 ^{aA} ±0.09	6.485 ^{bA} ±0.01	6.280 ^{bA} ±0.04	6.160 ^{bB} ±0.03	5.146 ^{cA} ±0.11
HW	7.435 ^{aA} ±0.09	7.030 ^{bB} ±0.08	6.445 ^{cC} ±0.02	6.265 ^{dB} ±0.01	6.205 ^{dA} ±0.02	4.855 ^{eB} ±0.00
TVC	7.350 ^{aC} ±0.07	6.985 ^{bC} ±0.04	6.460 ^{cB} ±0.07	6.215 ^{dC} ±0.08	6.120 ^{dC} ±0.03	4.910 ^{eB} ±0.05
SB	2.35 ^{aA} ±0.06	2.27 ^{bA} ±0.17	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
FBE	2.32 ^{aA} ±0.11	2.23 ^{bA} ±0.11	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
MGR	2.35 ^{aA} ±0.06	2.27 ^{bA} ±0.04	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
WMR	2.32 ^{aA} ±0.11	2.27 ^{abA} ±0.17	2.23 ^{bcA} ±0.11	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
LS	2.39 ^{aA} ±0.12	2.23 ^{bA} ±0.11	2.15 ^{cA} ±0.00	2.08 ^{cA} ±0.11	2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
SSB	2.30 ^{aA} ±0.00	2.27 ^{abA} ±0.04	2.23 ^{cbA} ±0.11	2.20 ^{bA} ±0.06	2.08 ^{dA} ±0.11	<2.00 ^{dA} ±0.00

Sampel	Tempoh Penyimpanan (bulan)					
	7	8	9	10	11	12
SA	4.781 ^{cdA} ±0.14	4.658 ^{dA} ±0.45	-	-	-	-
HW	4.764 ^{efA} ±0.05	4.710 ^{fa} ±0.15	-	-	-	-
TVC	4.900 ^{eA} ±0.22	4.779 ^{eA} ±0.03	-	-	-	-
SB	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
FBE	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
MGR	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
WMR	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
LS	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00
SSB	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00	<2.00 ^{dA} ±0.00

^{a-f} Abjad yang sama pada baris yang sama menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p>0.05$)

^{A-C} Abjad yang sama pada lajur yang sama menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p>0.05$)

± Sisihan piawai bagi 2 persampelan ($n = 2$)

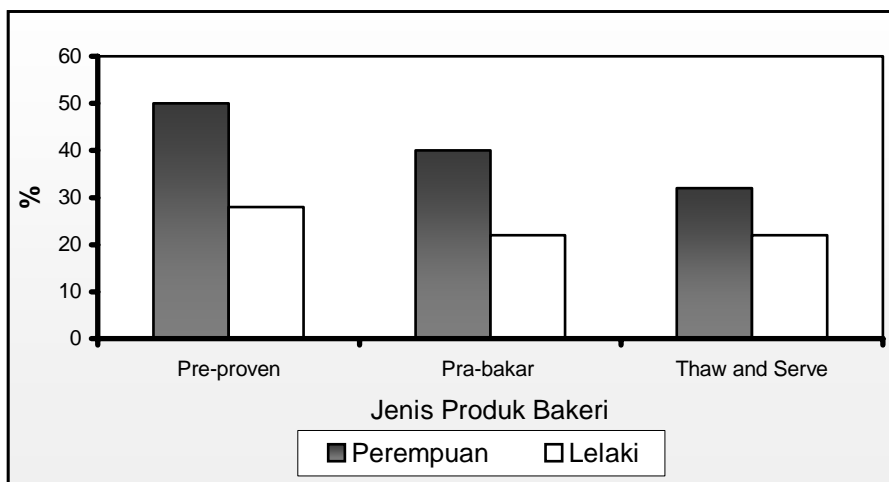
lebih rendah berbanding produk yang tidak mempunyai inti. Perbezaan nilai pH ini juga boleh disebabkan oleh pelbagai faktor seperti perbezaan peratusan formulasi dan penggunaan bahan ramuan yang berlainan bagi setiap jenis produk bakeri.

Keputusan analisis bagi nilai A_w menunjukkan pola penurunan bagi kesemua jenis produk bakeri di sepanjang kajian penyimpanan sejuk beku. Secara purata nilai A_w bagi semua produk bakeri ialah diantara 0.91 hingga 0.96. Secara teori, penyimpanan sejuk beku mampu merendahkan nilai A_w kepada sifar (Mallet, 1993). Penyimpanan sejuk beku dapat membekukan molekul air pada sistem makanan bagi mengurangkan pertumbuhan mikroorganisma (Rodriquez *et al.*, 1997).

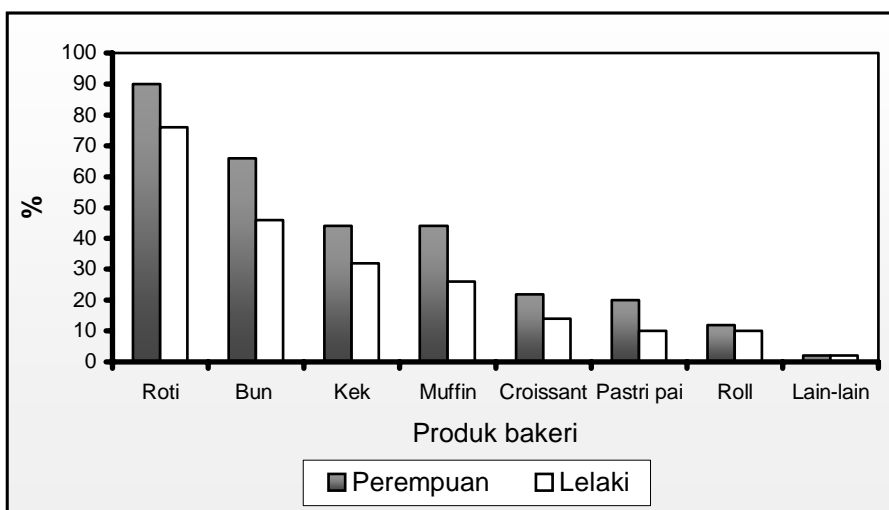
Keputusan soal selidik secara rawak terhadap penerimaan produk bakeri mengikut jantina, lelaki dan perempuan mendapati bahawa pelajar perempuan lebih kerap mengambil produk bakeri berbanding pelajar lelaki (Rajah 1). Pengetahuan di kalangan para pelajar mengenai produk bakeri sejukbeku ini amat terhad. Hanya 28% pelajar lelaki mengetahui

kewujudan produk bakeri sejukbeku dalam bentuk *pre-proven*, 22% pra-bakar dan 22% *thaw and serve*. Manakala tahap pengetahuan pelajar perempuan lebih tinggi iaitu 50% *pre-proven*, 40% prabakar dan 32% *thaw and serve*. Secara keseluruhan tahap pengetahuan pelajar perempuan adalah lebih tinggi berbanding pelajar lelaki.

Kesibukan para pelajar dalam menghadiri kelas dan mengulangkaji pelajaran menghadkan masa makan selain daripada faktor keewangan. Jenis produk bakeri yang paling kerap diambil oleh pelajar perempuan termasuklah Bun (66%), Kek (44%), Muffin (44%), Croissants (22%), Pai Pastry (20%) dan Roll (12%). Manakala pelajar lelaki juga mengambil Bun (46%), Kek (32%), Muffin (26%), Croissants (14%), Pastry pai (10%) dan Roll (10%) (Rajah 2). Kebanyakan pelajar ini mengambil produk bakeri disebabkan kesuntukkan masa untuk mengambil hidangan makan tengah hari. Faktor kebolehdapatan produk bakeri di kedai runcit dan kedai roti bagi pelajar yang tinggal di luar kampus serta di koperasi universiti dan kafeteria kampus bagi pelajar yang tinggal di



Rajah 1. Tahap Pengetahuan Bagi Jenis Produk Bakeri Sejukbeku Mengikut Jantina



Rajah 2. Jenis Produk Bakeri Yang Kerap Diambil Oleh Pelajar Mengikut Jantina

dalam kampus memudahkan lagi para pelajar untuk membeli dan mendapatkan produk bakeri.

Soal selidik juga mendapati pelajar lelaki mempunyai pengetahuan yang terhad mengenai produk bakeri *pre-proven*, pra-bakar serta *thaw and serve* berbanding pelajar perempuan. Hampir 80% pelajar-pelajar ini memahami konsep produk bakeri sejukbeku setelah membaca penerangan ringkas pada borang soal selidik tersebut.

4. Kesimpulan

Secara keseluruhannya, kesan penyimpanan sejukbeku terhadap produk bakeri samaada jenis *pre-proven*, pra-bakar serta *thaw and serve* dalam tempoh tertentu mampu merencat pertumbuhan mikroorganisma tertentu seperti

koliform najis, *E. coli*, *Salmonella* spp. serta *B. cereus* dan *Bacillus* spp. Berdasarkan kepada kriteria yang telah dikeluarkan oleh ICMSF (1990), maka kualiti mikrobiologi bagi semua sampel produk bakeri berada di dalam kategori yang 'MEMUASKAN'. Namun begitu, julat pH dan A_w masih berada di tahap yang mana sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisma patogen dan perosak. Secara keseluruhan tahap pengetahuan pelajar perempuan berkaitan produk bakeri adalah lebih baik berbanding pelajar lelaki tetapi secara keseluruhannya pengetahuan mengenai produk bakeri sejukbeku masih rendah.

5. Ucapan Terimakasih

Penghargaan dan terima-kasih ditujukan kepada Hiestand Malaysia Sdn. Bhd. di atas kerjasama penyelidikan ini.

6. Daftar Pustaka

Anon (2004). *Euromonitor International*. (atas talian). <http://www.mfa.org.my> (11 September 2004).

Che Omar, I., Ibrahim, D., Salleh, B. (1996). *Mikrobiologi Makanan*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur, hal. 68, 75, 215.

Faizah, A. A. (2004). *Kualiti mikrobiologi air di kilang roti Hiestand*. Tesis Ijazah Sarjana Muda Sains Makanan (Kep.), Program Sains Makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia.

International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). (1998). Cereal and cereal products. Dalam: *Microorganisms in Food: Microbial Ecology of Commodities*. Blackwell Scientific Publisher, London, hal. 45-51.

International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF). 1990. Sampling plans for cereal and cereal products. Dalam: *Microorganisms in Foods 2 Sampling for Microbiological Analyses: Principles and Specific Applications*. Ed. ke-2. Blackwell Scientific Publisher, London, hal. 206-211.

Legan, J.D. (1993). Mould spoilage of bread: The problem and some solutions. *Int. Biodet. Biodeg.* **32**(1-3): 33-53.

Mallet, C. P. (1993). *Frozen Food Technology*. Chapman and Hall, London, hal. 59-60.

Membre, J.M., Kubaczka, M., Chene, C. (2001). Growth rate and growth-no-growth interface of *Penicillium brevicompactum* as functions of pH and preservatives acid. *Food Microbiol.* **18**: 531-538.

Merck Microbiological Manual. (2000). Merck KgaA, Darmstadt, hal. 53, 54, 65, 79, 105, 157, 184, 185, 188, 191, 251.

Roberts, D., Hooper, W., Greenwood, M. (1995). *Practical Food Microbiology*. Public Health Laboratory Service, London, hal. 28.

Rodriquez, G., Callejo, M.J., Gill, G., 1997. Effect of water content and storage time on White Pan Bread Quality: Instrument evaluation. *Leben-Wissen und-Technol.* **206**: 268-273.

Suhr, K.I., Nielsen, P.V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *Int. J. Food Microbiol.* **90**:1-12.

Viljoen, B.C., Lues, J.F.R. (1993). The microbial populations associated with post-fermented dough and compressed baker's yeast. *Food Microbiol.* **10**(5): 379-386.

Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Tipe Baru yang Dikatalisis oleh Enzim *Laccase*

A. Herry Cahyana¹⁾, Siswati Setiasih¹⁾, Rossi M.T¹⁾, Noorlela¹⁾

¹⁾ Departemen Kimia FMIPA UI
Universitas Indonesia, Depok 16424
Indonesia
E-mail : herrykim@makara.cso.ui.ac.id

Abstrak

Dalam rangkaian pencarian senyawa yang mempunyai aktivitas biologi, diteliti pemanfaatan enzim dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) sebagai sumber enzim oksidoreduktase, khususnya enzim *laccase*. Ekstrak enzim kasar dapat diperoleh dari media tumbuh jamur tersebut dengan bufer fosfat pH 6,0 dan dalam uji aktivitas mampu mengkatalisis reaksi terhadap model senyawa fenolik, *guaiakol*. Enzim *laccase* dapat memanfaatkan senyawa *guaiakol* melalui reaksi kopling oksidasi yang ditandai dengan terbentuknya senyawa baru yang berupa senyawa berwarna yang tidak larut dalam media reaksinya. Dari proses pemurnian diperoleh senyawa yang berwarna kemerahan, dan uji lanjut secara spektroskopik menunjukkan adanya pergeseran nilai UV. Analisis lanjut dengan GC-MS diketahui senyawa tersebut adalah 4,4'-biguaiakol, suatu senyawa dimer dari substrat *guaiakol*. Senyawa tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang baik melalui uji radical scavenger DPPH.

Kata kunci : Enzim *laccase*, senyawa fenolik, 4,4'-biguaiakol, radical scavenger

1. Pendahuluan

Mengacu pada fenomena perubahan kondisi lingkungan yang dapat menimbulkan stres pada makhluk hidup khususnya tumbuhan, diketahui bahwa tumbuhan akan merespons stres tersebut dengan memanfaatkan senyawa kimia yang dimilikinya untuk membentuk senyawa baru (Kobayashi, 1998, Manitto, 1981). Aktivitas ini semakin efisien karena dapat menggunakan sistem enzim yang diketahui yaitu adanya bantuan enzim oksidoreduktase, yaitu enzim *peroxidase* dan *laccase* (Veitch, 2004, Podzdnjakova, 2004). Penelitian mengenai senyawa hasil metabolisme saat ini sangat menarik untuk dibahas lanjut karena senyawa tersebut dapat dimanfaatkan pula dalam rangka pencarian atas senyawa yang mempunyai aktivitas biologi yang kelak akan dapat memberikan sumbangan informasi bagi pengembangan bahan untuk kebutuhan farmasi, pertanian, kimia pangan dan industri lainnya

(Uyama, 2002).

Enzim oksidoreduktase dapat diperoleh dari berbagai jenis tanaman dan jenis jamur. Jenis jamur yang umumnya tergolong dalam kelas basidiomycetes diketahui sebagai sumber enzim *laccase*. Beberapa penelitian menunjukkan kemampuan suatu enzim *laccase* dalam mengkatalisis reaksi oksidasi senyawa fenolik yang menghasilkan bentuk polimer dari senyawa fenolik yang digunakan. Jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*), adalah jamur yang aman dikonsumsi dan digunakan sebagai sayuran. Jamur ini mengandung asam-asam amino esensial yaitu lisin, metionin, triptofan dan lain-lain dan mengandung sejumlah vitamin penting yaitu kelompok vitamin B, vitamin C, dan provitamin D, Kalium (K), Fosfor (P), dan Kalsium (Ca) (Henky, 2004). Tinjauan aktivitas sebagai zat antioksidan menarik perhatian untuk diteliti mengingat reaksi oksidasi adalah reaksi yang menimbulkan efek merugikan seperti dalam

aspek makanan memungkinkan timbulnya bau tengik dan sekaligus bersifat racun (Hudson, 1990), sedangkan secara luas dikenal sebagai stres oksidatif melalui tahapan pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai penyakit.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari penggunaan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*), sebagai sumber enzim *laccase* dan pemanfaatannya dalam pembentukan senyawa baru dari senyawa fenolik, guaiakol serta uji aktivitas sebagai zat antioksidan dengan kemampuan sebagai *radical scavenger*.

2. Percobaan

2.1 Isolasi Enzim kasar *laccase*

Isolasi enzim kasar *laccase* dilakukan sesuai dengan prosedur (Hernandez *et al*, 2001) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 500 gram jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) ditambahkan sedikit air, dihancurkan dengan cara diblender. Kemudian dicampurkan dengan buffer fosfat pH 6 dalam keadaan dingin, dan homogenat disaring, filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi. Aktivitas enzim dilakukan secara spektrofotometri dengan menggunakan metode katekol dan kadar protein enzim dilakukan dengan metode Lowry dan Folin Ciocalteau.

2.2 Reaksi pembentukan senyawa dari guaiakol

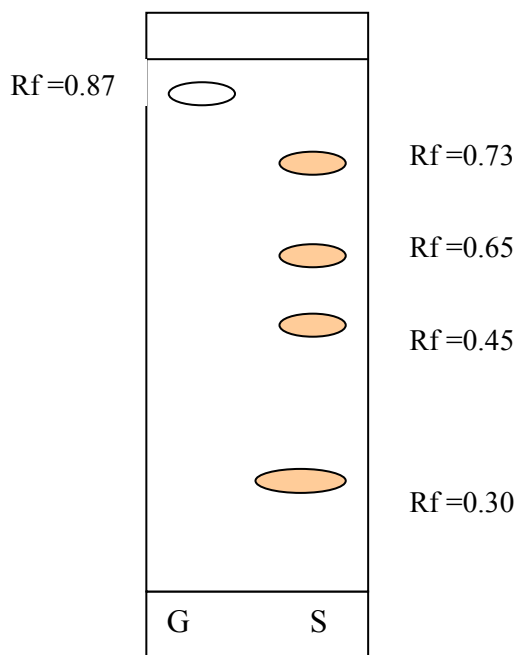
Reaksi pembentukan senyawa dilakukan dengan pencampuran langsung antara enzim *laccase* dengan guaiakol, produk yang diperoleh diekstrak dengan etil asetat dan dianalisis lanjut.

2.3 Uji Aktivitas *radical scavenger*

Uji aktivitas *radical scavenger* dilakukan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sesuai prosedur (Molyneux, 2004) dengan sedikit modifikasi. DPPH (0.4 mg) dilarutkan dalam 100 mL etanol, aktivitas *radical scavenger* diukur dengan pengamatan kemampuan menurunkan warna DPPH setiap selang waktu tertentu selama 30 menit, pada panjang gelombang, $\lambda=516$ nm menggunakan alat UV-Vis spektrofotometer. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

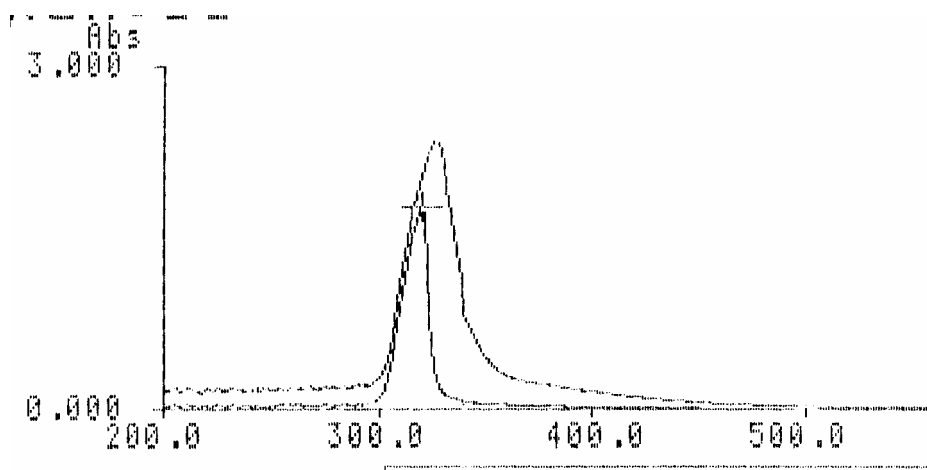
3. Hasil dan pembahasan

Dari jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) diketahui mempunyai kandungan enzim *laccase* dari hasil uji positif dengan metode Lowry dan Folin Ciocalteau. Pemanfaatan lanjut dilakukan dengan mencampurkan enzim tersebut dengan senyawa fenolik, guaiakol, diperoleh hasil terbentuknya senyawa yang mempunyai warna serta tidak larut lagi dalam sistem reaksi tersebut. Hal ini diduga telah

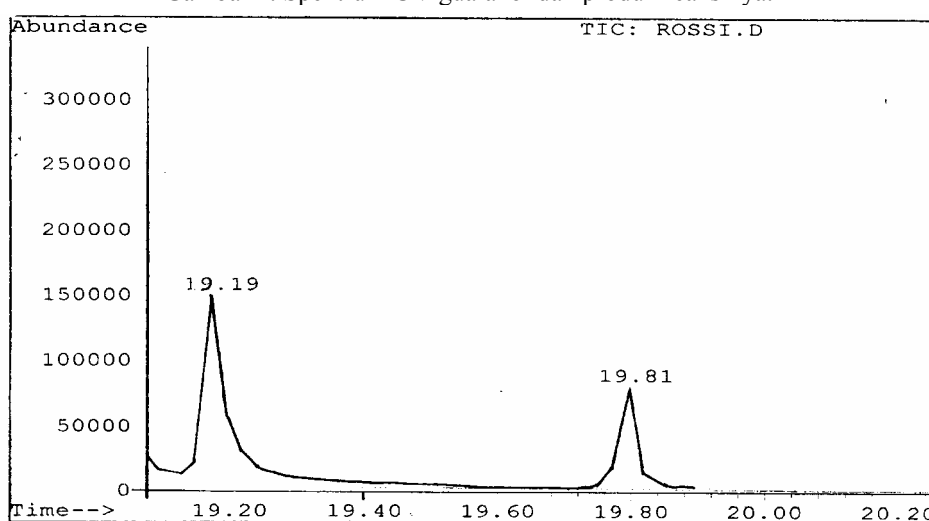


Keterangan : G = guaiakol S = senyawa hasil reaksi

Gambar 1. Kromatogram hasil reaksi guaiakol dengan enzim *laccase*



Gambar 2. Spektrum UV guaiakol dan produk reaksinya.



Gambar 3 Kromatogram isolat hasil pemurnian

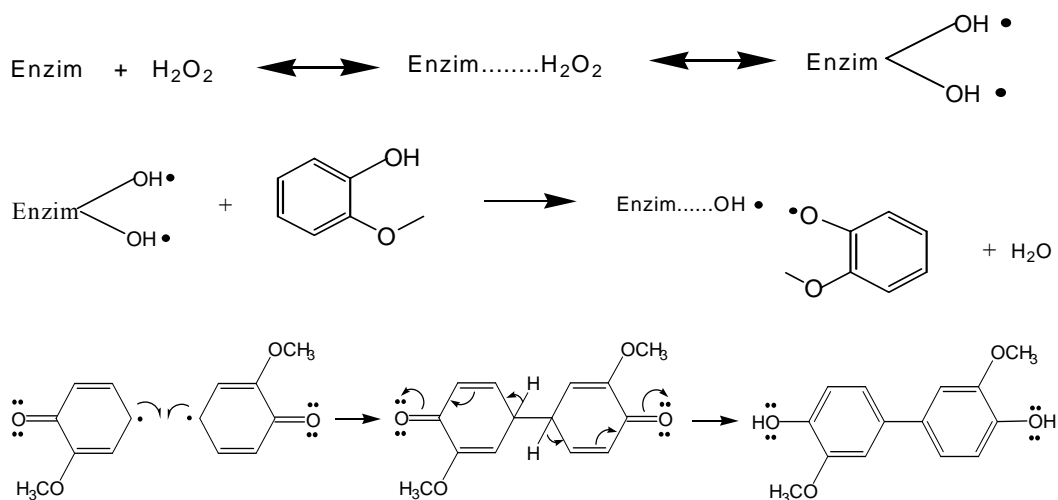
terjadi reaksi yang mampu menggabungkan substrat guaiakol menjadi senyawa dengan sifat fisik berbeda yaitu timbul warna dan menurunnya kelarutan. Identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel dengan larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat (5:3) diperoleh data sebagai berikut :

Pada tahap pemurnian lanjut menggunakan kolom kromatografi silika-gel dengan campuran pelarut antara *n*-heksana : etil asetat, dapat diisolasi noktah dengan R_f 0,30 berupa kristal kuning kecoklatan. Uji titik leleh terhadap terhadap isolat ini dihasilkan nilai 94-96^oC. Analisis lanjut dengan menggunakan spektrometri UV terlihat adanya pergeseran nilai dari guaiakol sebesar 319 nm menjadi 327 nm, seperti gambar 2.

Dari data diatas diduga terjadi telah terjadi pembentukan senyawa yang mempunyai

struktur mirip dengan guaiakol, dengan terlihat adanya penambahan ikatan rangkap konjugasi yang ditandai dengan naiknya nilai serapan serapan dalam spektrofotometri UV. Analisis menggunakan kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS) diperoleh kromatogram seperti pada gambar 3.

Puncak kromatogram pada R_t 19,19 selanjutnya diidentifikasi, diketahui mempunyai nilai $m/z = 246$, hal ini merupakan hasil dari reaksi pembentukan senyawa dari penggabungan antara dua molekul guaiakol. Konfirmasi lanjut yaitu membandingkan nilai m/z 246 tersebut terhadap standar yang ada, dan dengan tingkat kemiripan sebesar 91%, diperoleh data bahwa senyawa yang terbentuk ini diketahui sebagai 4,4'-biguaiakol., suatu struktur dari hasil penggabungan pada posisi *para-para* pada cincin aromatik dengan



Gambar 4. Mekanisme kopling oksidasi pembentukan 4,4'-biguaiakol

proposal mekanisme seperti tampak pada gambar 4.

Uji awal sebagai antioksidan dilakukan dengan metode DPPH terhadap senyawa 4,4'-biguaiakol yang diproduksi dengan bantuan enzim *laccase* ini. Kapasitas sebagai antioksidan dapat ditunjukkan oleh kemampuannya menurunkan intensitas warna larutan DPPH. Aktivitas senyawa 4,4'-biguaiakol mempunyai aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan guaiakol.

4. Kesimpulan

Dari penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) mengandung enzim *laccase* dan mampu menggunakan senyawa fenolik guaiakol sebagai substratnya dan menghasilkan senyawa baru menjadi 4,4'-biguaiakol, yaitu bentuk dimernya melalui reaksi oksidasi kopling, serta mempunyai aktivitas antioksidan sebagai *radical scavenger*.

5. Daftar Pustaka

Hanky, I., (2004) Teknologi Bioproses Pembibitan dan Produksi Jamur Tiram Untuk Peningkatan Nilai Tambah, *Jurnal Sains dan Teknologi*, 30 Oktober.

Hernandez, M.R.T., Munguia, A.L., Ramirez, R.O., (2001) Residual Compost of *Agaricus Bisporus* a Source of Crude Laccase for Enzymatic Oxidation of Phenolic compounds, *Process Biochemistry*, **36**, 635-639.

Hudson, B.J.F., 1990, *Food Antioxidant*, Elsevier Applied Science,

Kobayashi, A. (1998). Unique Ecosystem Under Plant-Microbe Interaction Can Produce New Types of Bioactive Compound, (1998), *Unesco-International Cooperative Regional Seminar and Workshop on Bioassay Guided Isolation of Bioactive Substances from Natural Product and Microbial Products*, Seoul, Republic of Korea.

Manitto, P. (1981). *Biosintesis Produk Alam*. Terj. dari *Biosynthesis of Natural Products*, Koensomardiyah. Penerbit: IKIP Semarang Press.

Mann, J., *Secondary Metabolism*, 1987, Clarendon Press, Oxford.

Molyneux, P., (2004), The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211-219.

Podzdyakova, N.N., Nowak, J. R., Turkovskaya, O.V., (2004), Catalytic Properties of Yellow Laccase from *Pleurotus ostreatus* D1, *Journal Molecule. Catalysis Enzymatic*, **30**, 19-24.

Uyama, H and Kobayashi, S. (2002). Enzyme-Catalyzed Polymerization to Functional Polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **19-20** : 117-127.

Veitch, N.C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *J. Phytochemistry*. **65** : 249-259.

Wang, H.X, Ng, T.B, (2004), A Novel Laccase with Fair Thermostability from The Edible Wild Mushroom (*Albatrella dispansus*), *Biochem. Biophys Res.*, **319**, 381-385.

Characterisation of Lead/acid Battery Materials: The Development of Long Life Maintenance-free Lead/Acid Batteries.

Achmad Rochliadi¹⁾, Roland De Marco²⁾

1) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl.Ganeca 10 Bandung-40132, Indonesia
e-mail : achmad@chem.itb.ac.id

2) Departement Applied Chemistry, Curtin University of Technology
Bentley, Perth, Western Australia
e-mail : r.demarco@curtin.edu.au

Abstract

The lead/acid battery, LAB, is a commonly used power source in everyday life. The main use of the LAB has been in automotive start-lighting-ignition (SLI), nowadays it also used in back up power, along with communication, standby power, industry, electric vehicles, etc. In this context, it is important to have long life high maintenance-free LABs for modern applications.

To understand how the mechanism of the battery works is important to perform a post-mortem failure analyses. Several characterization techniques were used to analyze the various components of positive plates, namely X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Enviromental Scanning Electron Microscopy (ESEM), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Electron Impedance Spectroscopy (EIS). This work will investigate the possibilities of using above mentioned techniques to understand the passivation process of positive plates at both the grid/corrosion layer interface, along with the active material, via monitoring of deleterious phases such as lead monoxide and lead sulphate.

1. Introduction

Batteries are devices that can change chemical energy into electricity. With the world dependent on electricity and mobility, batteries are playing an enhanced role in all aspects of life. Batteries represent an efficient way to produce electricity which is portable. They also provide a form of replacement power for the utility electrical grid, yielding a mobile type of power supply.

The lead/acid battery (LAB) has been used in many applications such as automotive starting lighting ignition (SLI), power sources in electric vehicles, uninterruptable power supply (UPS), back up power systems, telecommunication systems, traction duties (fork lift), etc. It is well known that the utilisation of the LAB capacity is still very low. Research has concentrated on identifying the

causes of the low utilisation in the LAB. This information will be used to implement an appropriate strategy to enable the development of the next generation of high performance maintenance-free LABs. This significant outcome will consolidate existing markets for LABs (e.g. traction and automotive) along with creating new markets (e.g. electric vehicles), leading to enormous economic benefits for battery manufacturers and battery-operated appliances.

The research conducted at the Curtin University of Technology Lead/acid Battery research group is using several techniques to characterize the components of the LAB to identify causes of passivation of the LAB. These techniques include: X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Environmental Scanning Electron Microscopy

(ESEM), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Electron Impedance Spectroscopy (EIS).

XRD may be used to reveal the different lead phases in plates (Cui & Luo 2000; De Marco & Jones 2000; De Marco & Liesegang 1995; Hill, Foxworthy & White 1990; Petersson & Ahlberg 2000a). Electrolyte stratification along with a diminution in the agglomeration of spheres, causes a reduction in the efficiency of lead/acid batteries, and clearly related to a short term loss in performance. This process gives rise to PbSO_4 , which can be analysed using XRD. Numerous authors have demonstrated that sulfation is one of the significant factors that cause a diminution in the conductivity of plates leading to premature capacity loss (PCL) (Apâteanu, Hollenkamp & Koop 1993; Chao et al. 1995; Newnham & Baldsing 1997; De Marco & Jones 2000).

SEM and ESEM are a powerful method that can be used to reveal the microstructural features of the corrosion layer that forms at the grid/active material phase (De Marco, Rochliadi & Jones 2001; De Marco & Jones 2000; Dengke 1999; Meissner 1999; Culpin, Hollenkamp & Rand 1992; Bagshaw 1997; Petersson & Ahlberg 2000b). In SEM/ESEM, the nature and thickness of the corrosion layers arising from the different treatments may be examined. It is generally assumed that the thickness of the corrosion layer and, in particular any underlayers of PbO and/or PbSO_4 , is related to poor performance. Several authors have reported ways to reduce the effects of the corrosion layer using different grid alloys and/or small additions of tin, aluminium, silver and cadmium in the alloys (Zhong et al. 1996; Fouache 1999; Caillerie & Albert 1997; Dimitrov & Pavlov 2001; Rocca & Steinmetz 1999). The corrosion underlayer of PbO could also be removed by etching the grid with sodium hydroxide prior to the pasting of plates; this step removes the basic lead carbonate phase that induces the formation of insulating PbO in the grid/active material layer (De Marco, Rochliadi & Jones 2001).

XPS is a powerful technique for detection of variations in chemical composition and oxidation state. Subtle changes in peak positions and shape can yield important information on changes in surface chemistry (Kratos 2003; Musal 2003).

The electrode kinetic factors responsible for improvements in battery cycle-life will also be investigated using EIS. EIS is a powerful technique that provides kinetic information about the electrical properties of the dynamically changing electrode/electrolyte interface, and has been used by several authors to investigate kinetic factors responsible for improvements in battery cycle-life (Roberge et al. 1990; Diard et al. 1997; Diard, Gorrec & Montella 1998; Cheng et al. 1999; Karden, Buller & De Doncker 2000; Li, Huang & Chen 1999; Pavlov & Petkova 2002). The state of health (SOH) of the positive plate can be determined by evaluating the values of charge-transfer resistance, ion diffusion resistance, resistance of the grid-PAM interface, and ohmic resistance of the electrode, as revealed by EIS measurements (Pavlov & Petkova 2002).

2. Experimental

For XRD analyses, the failed positive plates were dismantled and rinsed in distilled water followed by drying at 50°C for 24 hours. The material was analysed using a Kristallofleec Siemens D500 X-Ray diffractometer fitted with a Cu K-alpha X-ray tube that was operated at an accelerating voltage of 25 kV. The sampling scheme is shown in Figure 1.

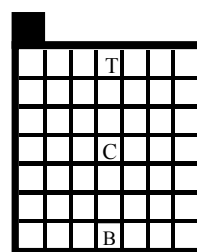


Figure 1. A schematic diagram showing the sampling scheme used in the post mortem analysis of positive plates.

For SEM analysis, the grid corrosion layers of epoxy mounted, polished cross sections of positive plates were examined using a JEOL JSM 35c electron microscopy operated at a beam current of 200 pA and an accelerating voltage of 25 kV.

In ESEM studies, an accelerating voltage of 30 kV and a spot size of 40 were employed in the measurement of all images and the chamber pressure was set to 1.2 torr. The ESEM work

was undertaken using the Electroscan ESEM(S)E-3 instrument available at the electron microscopy centre at The University of Western Australia.

For XPS analyses, the grid corrosion layers of epoxy mounted, polished cross sections of positive plates were examined by selected area XPS at the University of New South Wales.

For EIS, the measurements were undertaken using an electrochemical impedance analyser (EG & G instruments model 6310) that was interfaced to a Radiometer Copenhagen Research pH meter (Model PHM84). A frequency range of 10 mHz to 100 kHz, and an AC amplitude of 10 mV rms, were employed in the measurements. The electrochemical cell consisted of a platinum counter electrode, a calomel reference electrode, and a miniaturised LAB working electrode. The measurements

were performed at 25°C.

3. Result

The SEM backscattered electron image for a polished cross-section of a positive plate revealed a corrosion layer that is approximately 10 microns in thickness. The phases that are rich in heavy elements (e.g., Pb metal) are registered as bright spots, while the regions that are low in heavy metals (e.g., PbO₂) give rise to dark spots. The intermediate film between the layers is probably an insulator of alpha-PbO. This insulator is degrading the performance of the battery life (Figure 2).

The XRD data presented in Table 1 showed that lead sulfate formed on plates subjected to increased levels of cycling causing passivation of the active material.

Figure 3 presents the XPS spectrum of the Pb(4f_{7/2}) core atomic level for a region crossing



Figure 2. SEM backscattered electron micrograph of a polished cross-section of a positive lead/acid battery plate.

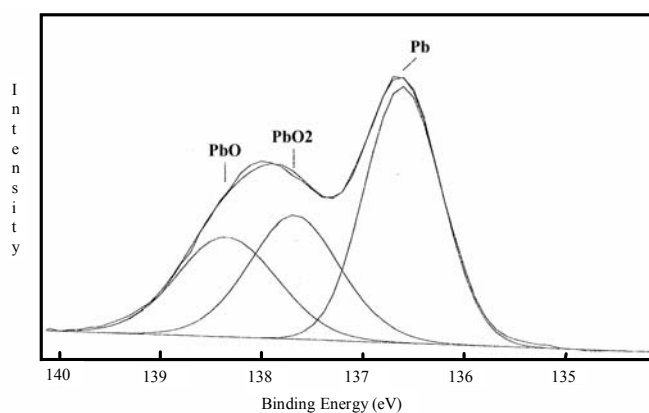


Figure 3. XPS spectrum of the Pb(4f_{7/2}) core level for a region crossing the boundary between the grid corrosion layer encompassing the outer film of lead dioxide (i.e., PbO₂), along with its associated underlayer film of lead monoxide (i.e., PbO), and the grid metal (i.e., Pb).

Table 1. XRD phase compositions of lead/acid battery positive plate active materials at different stages of cycling. The prefix number refers to the cycle number, while the symbols T, C and B refer to top, centre and bottom of plate, respectively.

Sample	$I_{\alpha\text{-PbO}_2}$ (c/s)	$I_{\beta\text{-PbO}_2}$ (c/s)	I_{PbSO_4} (c/s)	PbSO ₄ (%)
3T	409	980	6	0.43
3C	450	956	19	1.33
3B	415	945	29	2.09
6T	334	997	7	0.52
6C	306	981	22	1.68
6B	377	1000	135	8.93
9T	169	1000	14	1.18
9C	195	1000	37	3.00
9B	270	1000	404	24.13
12T	224	1000	19	1.52
12C	268	999	105	7.65
12B	364	1000	296	17.83
15T	149	1000	13	1.12
15C	135	1000	131	10.35
15B	272	1000	428	25.18
18T	156	1000	14	1.20
18C	161	1000	146	11.17
18B	359	1000	435	24.25

the boundary between the grid corrosion layer encompassing the outer film of lead dioxide (i.e., PbO₂), along with its associated underlayer film of lead monoxide (i.e., PbO), and the grid metal (i.e., Pb). The PbO₂, PbO and Pb line scans were measured, and are presented in Figure 4. The XPS data show unambiguously an underlayer of insulating PbO in the LABs corrosion layer, and this passivation layer contributes to premature capacity loss of the battery.

The EIS Nyquist plot presented in Figure 5 reveals a semicircle corresponding to interfacial

resistive components that reflect the electrochemical behaviour of the working electrode. The spectrum for a miniaturised lead/acid battery electrode (Figure 5) reveals a low frequency semicircle that is attributable to the charge transfer impedance which is representative of the rate of the electrochemical reaction. The near straight line at 45 degrees at very low frequencies is attributable to a significant diffusional resistance that is known as the Warburg impedance.

The ESEM results presented in Figure 6 demonstrate that an appropriate grid etching

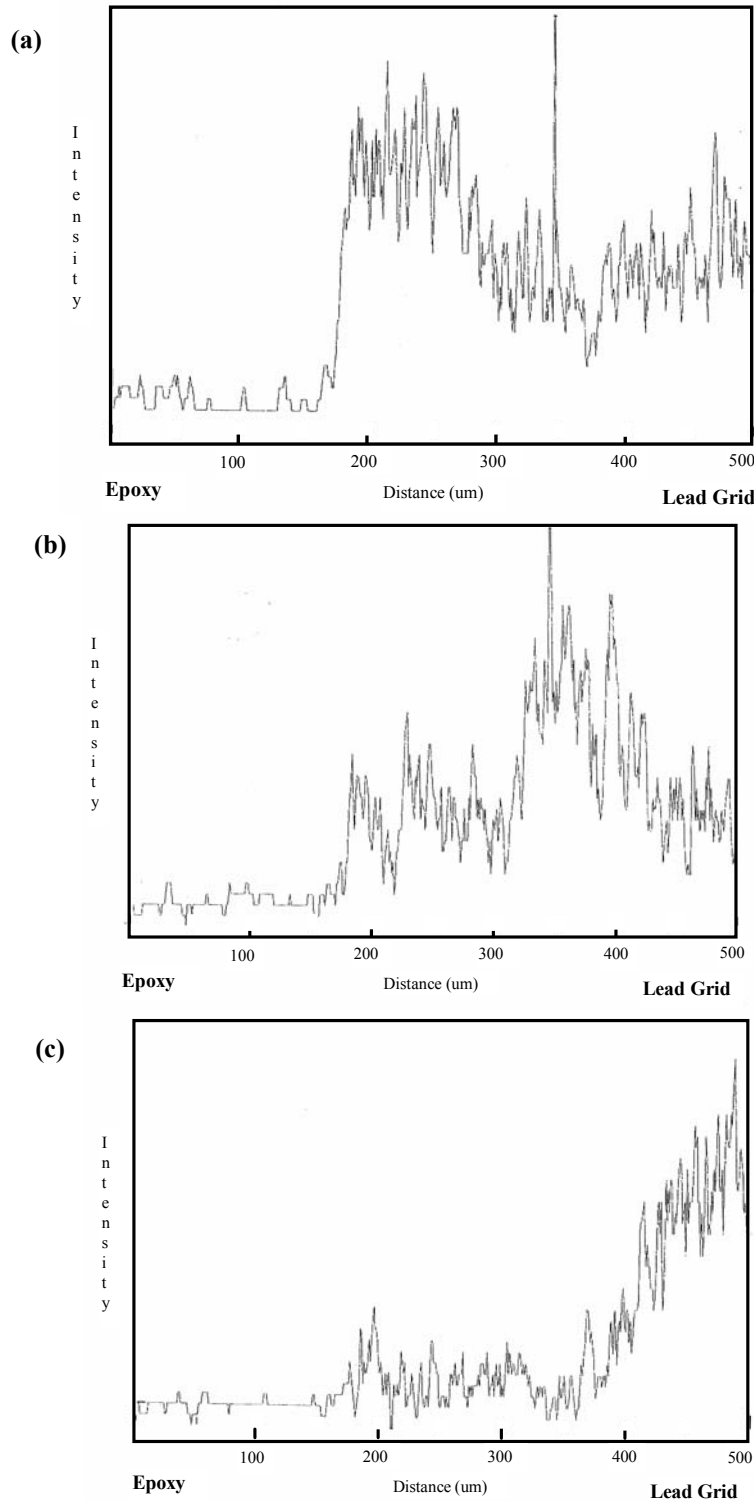


Figure 4. Lead dioxide, (a) PbO_2 , lead monoxide, (b) PbO and lead, (c) Pb , XPS line scans for a polished cross-section of a cured lead/acid battery plate that was subjected to 6 charge/discharge cycles

procedure removes all grid surface hydrocerussite. ESEM is capable of providing high resolution images of the wet surface that are indeed representative of the grid surfaces encountered during plate pasting.

The secondary electron micrograph for an as received grid [see Figure 6(a)] revealed crystalline deposits of detrimental hydrocerussite, while the etched specimen [see Figure 6(b)] revealed the roughened grid

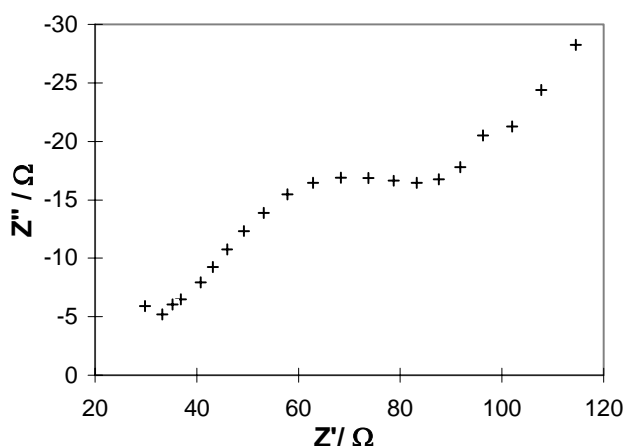


Figure 5 EIS Nyquist plot for a miniaturised lead/acid battery electrode

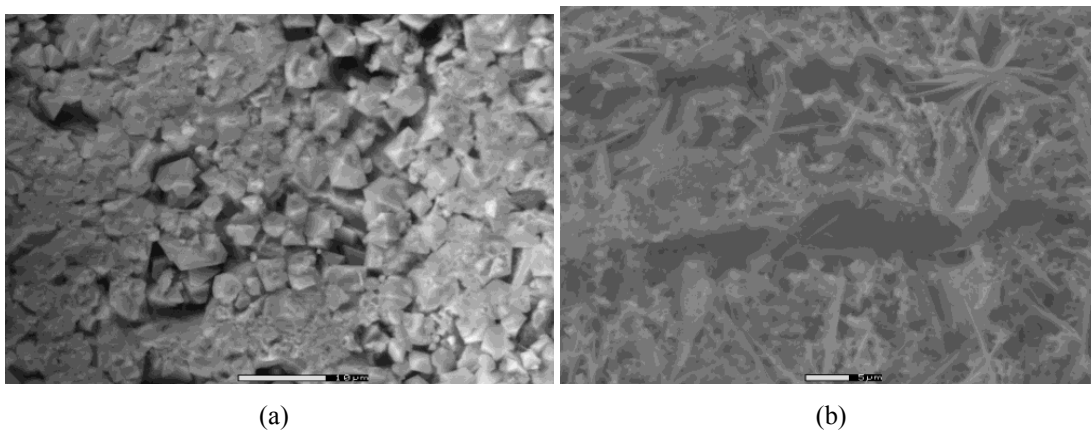


Figure 6. ESEM backscattered electron micrographs of (a) as received lead/acid battery grid and (b) etched grid.

topography that develops after dissolution of the crystalline deposits of grid hydrocerussite.

4. Conclusion

The results of this study demonstrate the power of materials science characterization techniques in the identification of causes of failure in lead/acid batteries. The SEM/ESEM techniques can reveal the underlayer corrosion layer between grids and active material of LAB. XRD shows the composition of lead sulphate that form in the positive active material, and also show a stratification effects within the differences height if the plate. The XPS data show unambiguously an underlayer of insulating PbO in the LABs corrosion layer, and this passivation layer contributes to premature capacity loss of the battery. EIS will show the electrochemical behaviour of the working electrode.

A grid pretreatment has been developed that removes detrimental grid hydrocerussite, and this procedure has been used to extend the lifetime of the lead/acid battery by approximately 20%

5. Acknowledgments

The authors thank the Centre Grant, ARC and AEDB for financial support.

6. References

- Apâteanu, J., Hollenkamp, A. F. & Koop, M. J. 1993, 'Electrolyte stratification in lead/acid batteries: Effect of grid antimony and relationship to capacity loss', *Journal of Power Sources*, vol. 46, pp. 239-250.
- Bagshaw, N. E. 1997, 'Improving active-material utilization', *Journal of Power Sources*, vol. 67, pp. 105-109.
- Caillerie, J.-L. & Albert, L. 1997, 'Lead-calcium alloy development: quality improvement', *Journal of Power Sources*, vol. 67, pp. 279-281.

- Chao, C. W., Lin, S. P., Wang, Y. Y., Wan, C. C. & Yang, J. T. 1995, 'Continuous monitoring of acid stratification during charge/discharge by holographic laser interferometry', *Journal of Power Sources*, vol. 55, pp. 243-246.
- Cheng, S., Zhang, J., Zhao, M. & Cao, C. 1999, 'Electrochemical impedance spectroscopy study of Ni/MH batteries', *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 293-295, pp. 814-820.
- Cui, N. & Luo, J. L. 2000, 'An AC impedance study of self-discharge mechanism of nickel-metal hydride (Ni-MH) battery using Mg₂Ni-type hydrogen storage alloy anode.' *Electrochimica Acta*, vol. 45, pp. 3973-3981.
- Culpin, B., Hollenkamp, A. F. & Rand, D. J. 1992, 'The effect of tin on the performance of positive plates in lead/acid batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 38, pp. 63-72.
- De Marco, R. & Jones, J. 2000, 'Change in positive lead/acid battery plate during charge/discharge cycling', *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 30, pp. 77-83.
- De Marco, R. & Liesegang, J. 1995, 'Surface analysis of commercial lead/acid battery grids', *Applied Surface Science*, vol. 84, pp. 237-244.
- De Marco, R., Rochliadi, A. & Jones, J. 2001, 'Extending the life of maintenance-free lead/acid batteries by etching of grids in sodium hydroxide', *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 31, pp. 953-959.
- Dengke, Q. 1999, 'Changes in the structure of active materials in lead/acid batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 78, pp. 88-93.
- Diard, J.-P., Gorrec, B. L. & Montella, C. 1998, 'EIS study of electrochemical battery discharge on constant load', *Journal of Power Sources*, vol. 70, pp. 78-84.
- Diard, J.-P., Gorrec, B. L., Montella, C. & Landaud, P. 1997, 'Constant load vs constant current EIS study of electrochemical battery discharge', *Electrochimica Acta*, vol. 42, pp. 3417-3420.
- Dimitrov, M. K. & Pavlov, D. 2001, 'Influence of grid alloy and fast charge on battery cycle life and structure of the positive active mass on lead/acid batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 93, pp. 234-257.
- Fouache 1999, 'Effect of calcium, tin and silver contents in the positive grids of automotive batteries with respect to the grid manufacturing process', *Journal of Power Sources*, vol. 78, pp. 12-23.
- Hill, R. J., Foxworthy, A. M. & White, R. J. 1990, 'PEAKS[®]: A PC based method for quantitative X-ray diffraction phase analysis of lead/acid battery materials', *Journal of Power Sources*, vol. 32, pp. 315-328.
- Karden, E., Buller, S. & De Doncker, R. W. 2000, 'A method for measurement and interpretation of impedance spectra for industrial batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 85, no. 1, pp. 72-78.
- Kratos 2003, *AXIS Ultra : High Performance Imaging XPS : Overview*, Available: [www.kratosanalytical.net/applications/AxisUltra/overview.html] (3 November 2004).
- Li, H., Huang, X. & Chen, L. 1999, 'Electrochemical impedance spectroscopy study of SnO and nano-SnO anodes in lithium rechargeable batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 81-82, pp. 340-345.
- Meissner, E. 1999, 'How to understand the reversible capacity decay of the lead dioxide electrode', *Journal of Power Sources*, vol. 78, pp. 99-114.
- Musal 2003, *XPS Services*, Available: [http://www.phys.murdoch.edu.au/musal/xpsservices.html] (3 November 2004).
- Newnham, R. H. & Baldsing, W. G. A. 1997, 'Performance of flooded- and gelled-electrolyte lead/acid batteries under remote-area power-supply duty', *Journal of Power Sources*, vol. 66, pp. 27-39.
- Pavlov, D. & Petkova, G. 2002, 'Phenomena that limit the capacity of the positive plate lead/acid battery plates. II. Electrochemical impedance spectroscopy and mechanism of discharge of the plate', *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 149, no. 5, pp. A654-A661.
- Petersson, I. & Ahlberg, E. 2000a, 'On the question of electrochemical activity of differently formed lead dioxides', *Journal of Power Sources*, vol. 91, pp. 137-142.
- Petersson, I. & Ahlberg, E. 2000b, 'Oxidation of electrodeposited lead-tin alloys in 5 M H₂SO₄', *Journal of Power Sources*, vol. 91, pp. 143-149.
- Roberge, P. R., Halliop, E., Verville, G. & Smit, J. 1990, 'Non-destructive characterization of sealed lead/acid battery cells with electrochemical impedance spectroscopy.' *Journal of Power Sources*, vol. 32, pp. 261-270.
- Rocca, E. & Steinmetz, J. 1999, 'Mechanism of passivation of Pb(Ca)-Sn alloys in sulfuric acid : role of tin', *Electrochimica Acta*, vol. 44, pp. 4611-4618.
- Zhong, S., Liu, H. K., Dou, S. X. & Skyllas-Kazacos, M. 1996, 'Evaluation of lead-calcium-aluminium grid alloys for valve-regulated lead/acid batteries', *Journal of Power Sources*, vol. 59, pp. 123-129.

Pengaruh Temperatur dan Inhibisi oleh Natrium Nitrit dan Natrium Asetat Terhadap Laju Korosi Spesimen Baja Karbon ASTM 106 Gr B dari Pipa Minyak Unocal Indonesia, Co.

Achmad Rochliadi, Rifa Rachmah, Bambang Ari Wahjoedi

Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganeca 10 Bandung-40132, Indonesia
Corresponding e-mail : achmad@itb.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh temperatur dan mencoba dua senyawa anorganik sebagai inhibitor korosi, yaitu Natrium Nitrit (NaNO_2) dan Natrium Asetat (CH_3COONa), untuk spesimen baja karbon ASTM 106 Gr B pipa minyak Unocal Indonesia, Co. Terlihat bahwa ada perluasan bintik korosi pada spesimen baja karbon ASTM 106 Gr B sejalan dengan waktu baik pada pengukuran pada suhu 27°C , 50°C , 70°C dan 100°C . Perluasan bintik terbesar terjadi pada temperatur pengukuran 100°C . Perluasan ini diduga terjadi karena adanya molekul air dalam fasa uap pada permukaan spesimen baja karbon, dan semakin tinggi suhu maka jumlah molekul air dalam fasa uap semakin bertambah banyak yang akan mendorong proses korosi semakin cepat terjadi. Efektifitas inhibitor diukur dengan melihat tahanan polarisasi dari sistem sel elektrokimia yang ditambahkan dengan masing-masing inhibitor. Pada inhibitor NaNO_2 inhibisi maksimum terjadi pada saat konsentrasi 0.1% dengan nilai R_p sebesar $2200.0 \text{ kohm.cm}^{-2}$, dan inhibisi maksimum CH_3COONa dicapai saat konsentrasinya 0.3% dengan nilai R_p $9350 \text{ kohm.cm}^{-2}$. Secara ekonomi metoda pengukuran secara elektrokimia ini dianggap efektif. Mekanisme inhibisi dari kedua senyawa inhibitor anorganik ini diduga karena adanya lapis tipis yang terbentuk pada permukaan baja karbon tersebut yang akan mengurangi laju korosi, hal ini dapat dilihat dari tahanan polarisasi (R_p). Tahanan Polarisasi didapat dari Tafel Plot yang di peroleh dari pengukuran secara elektrokimia. Pada pengukuran digunakan elektroda kerja baja karbon ASTM 106 Gr B, Saturated Calomel Electrode (SCE) sebagai elektroda pembanding, dan Platina sebagai elektroda bantu.

Kata Kunci: Korosi, Inhibitor Anorganik, Bintik Korosi, Tafel Plot

1. Pendahuluan

Korosi berasal dari bahasa latin *Corrodere* yang artinya perusakan logam atau karat (Supardi 1997). Korosi adalah proses degradasi atau rusaknya material yang disebabkan pengaruh lingkungan sekitar. Proses korosi terjadi karena logam yang telah diekstraksi dari bijihnya di alam akan kembali menjadi oksidanya. Beberapa spesi-spesi kimia dapat mempercepat terjadinya korosi, spesi ini antara lain , oksigen, karbon dioksida, ammonia, asam, basa, garam asam, dan spesi-spesi oksidator (Jones 1992). Proses korosi adalah suatu proses alamiah yang tidak mungkin

dihindari. Yang dapat dilakukan adalah mengendalikan proses korosi sehingga kerugian yang muncul dapat dikurangi.

Dalam dunia industri korosi adalah suatu masalah yang umum terjadi terlebih pada industri perminyakan, sehingga korosi sering disebut sebagai suatu 'penyakit' (Jones 1992). Pada penelitian ini diamati proses korosi merata secara elektrokimia yang terjadi pada pipa minyak tipe ASTM 106 Gr B di Perusahaan minyak Unocal Indonesia Co. sebagai fungsi dari temperatur. Beberapa peneliti telah mengamati pengaruh temperatur ini terhadap laju korosi dan mekanisme

korosinya untuk berbagai macam logam lainnya (Brook 1972, Azim dan Sanad 1972, Tortoreli dan Natesan 1998, Stott dan Shih 2000, Huang dkk 1984). Pengamatan dilakukan dengan melihat jumlah bintik korosi rata-rata dari contoh logam tersebut. Pengamatan juga dilakukan dengan menggunakan teknik elektrokimia yaitu dengan mengukur tahanan polarisasinya.

Senyawa anorganik dapat digunakan untuk mengendalikan laju korosi. Dalam penelitian ini dipilih Natrium Nitrit (NaNO_2), dan Natrium Asetat (CH_3COONa) untuk mengendalikan korosi dari spesimen yang diamati. Senyawa-senyawa ini akan berinteraksi dengan permukaan baja karbon membentuk lapis tipis melalui mekanisme adsorpsi (Dai 1997, Sastri dan Elboudjaini, 1996).

2. Peralatan

Pengukuran secara elektrokimia dilakukan dengan Potensiostat dan Galvanostat Volta Lab PG2-301. Pengukuran secara kuantitatif ini dilakukan dengan sel elektrokimia, menggunakan baja karbon ASTM 106 Gr B sebagai elektroda kerja, *Saturated Calomel Electrode* sebagai elektroda pembanding, dan platina sebagai elektroda bantu. Alat-alat gelas umum, seperti gelas kimia, pipet tetes, batang pengaduk, juga digunakan dalam penelitian ini.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pengaruh temperatur pada spesimen logam ASTM 106 Gr B

Temperatur merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi terbentuknya bintik korosi pada permukaan material, hal ini dapat dilihat pada Tabel 1. Pada temperatur tinggi, 100°C , jumlah bintik korosi meningkat, ditunjukkan dengan perluasan area yang ditempati oleh bintik-bintik korosi. Perluasan ini disebabkan adanya molekul air pada permukaan spesimen baja karbon. Air mencapai titik didihnya pada 100°C . Pada suhu ini terjadi perubahan fasa air dari fasa cair ke fasa uap. Peningkatan jumlah molekul air dalam fasa uap menyebabkan jumlah material awal pembentuk lapisan tipis elektrolit di permukaan material bertambah. Terbentuknya lapisan tipis, mendorong proses korosi semakin cepat terjadi, terlihat dari meningkatnya jumlah bintik korosi rata-rata dan meluasnya bintik-bintik korosi pada permukaan baja karbon.

Pertambahan rata-rata bintik korosi akibat temperatur ditunjukkan pada Gambar 1

3.2 Pengukuran dengan menggunakan metoda elektrokimia

Hasil pengukuran sampel dengan menggunakan metoda elektrokimia akan memberikan kurva Tafel seperti yang terlihat pada Gambar 2. Kurva pada Gambar 2 ini diperoleh dari hasil pengukuran untuk sampel ASTM 106 Gr B yang telah terinhibisi NaNO_2 pada pH 7.5 dan temperatur 27°C , dengan kondisi sel elektrokimia ter-aerasi. Kurva pada Gambar 2 ini dikenal sebagai Kurva Tafel (*Tafel Plot*).

Dalam penelitian ini pengukuran dengan menggunakan elektrokimia dilakukan untuk mengamati pengaruh inhibitor yang memberikan perlindungan terbaik terhadap logam dalam mengurangi laju korosi.

3.3 Hasil Pengukuran Tahanan Polarisasi

Pada pengukuran Tafel, besarnya tahanan polarisasi (*Polarisation Resistance, Rp*) dihitung secara otomatis oleh komputer. Dengan pemakaian 2 jenis inhibitor dan variasi konsentrasi inhibitor maka diperoleh besarnya tahanan polarisasi dan laju korosi (*corrosion rate, CR*) yang di tampilkan pada Tabel 2.

Kurva Tahanan Polarisasi terhadap konsentrasi inhibitor dapat dilihat pada Gambar 3.

Nilai tahanan polarisasi tersebut di atas dipengaruhi oleh lapis tipis yang terbentuk dari masing-masing senyawa pada saat proses pemaparan. Dari Gambar 3 terlihat bahwa nilai terbesar R_p dihasilkan oleh NaNO_2 pada konsentrasi 0.1% dan CH_3COONa 0.3%. Hal tersebut dikarenakan pada konsentrasi-konsentrasi tersebut inhibitor bekerja secara maksimal dalam membentuk lapis tipis pada permukaan baja karbon.

3.4 Pembentukan lapis tipis pada permukaan baja karbon

Ketika logam dipapar ke sistem larutan yang mengandung senyawa aktif, maka akan terbentuk besi karbonat. Selain itu pada permukaan logam juga terbentuk lapis tipis yang merupakan selaput pelindung terhadap korosi. Lapis tipis ini terbentuk karena adsorpsi senyawa aktif di permukaan logam dan akan membatasi interaksi logam dengan lingkungan.larutannya Pembatasan ini

ditunjukkan dengan naiknya tahanan polarisasi ketika logam dipapar ke dalam sistem. Tahanan polarisasi tersebut dibandingkan dengan nilai tahanan polarisasi ketika logam mengalami proses pra-korosi.

3.4.1 Lapisan Senyawa Natrium Nitrit (NaNO_2)

Senyawa Natrium Nitrit (NaNO_2), dengan struktur pada Gambar 4(i) dapat teradsorpsi pada permukaan baja karbon. Adsorpsi terjadi karena ada sumbangan pasangan elektron bebas terhadap orbital d kosong pada baja karbon. Peristiwa tumpang tindih elektron dapat dilihat pada Gambar 5.

Akibat adsorpsi NaNO_2 pada permukaan baja karbon, akan terbentuk lapis tipis. Pembentukan lapis tipis ini dapat terjadi karena adanya tumpang tindih elektron dari besi karbonat dengan elektron bebas atom N dari NaNO_2 karena pori permukaan baja karbon tidak cukup luas untuk dilapisi oleh NaNO_2 saja. Gambar 6 dan 7 memberikan ilustrasi untuk proses pembentukan lapis tipis.

3.4.2. Lapisan Senyawa Natrium Asetat (CH_3COONa)

Struktur Natrium Asetat (CH_3COONa) dapat dilihat pada Gambar 4(ii). Sama halnya dengan proses pembentukan lapis tipis oleh NaNO_2 , maka CH_3COONa juga dapat teradsorpsi pada permukaan baja karbon. Namun tumpang tindih yang terjadi pada natrium asetat adalah akibat interaksi elektron bebas dari atom O dengan orbital d kosong dari lapisan besi karbonat. Kemungkinan mekanisme yang terjadi juga mirip dengan NaNO_2 , yaitu terjadi lapis tipis yang menutupi lapis besi karbonat. Gambar 8 memberikan ilustrasi adsorpsi pada permukaan baja karbon.

3.5. Kajian Lapis Tipis yang Terbentuk

Lapis tipis yang terbentuk dari kedua senyawa Natrium memiliki kemungkinan mekanisme pembentukan yang sama. Proteksi yang berbeda diukur oleh nilai tahanan polarisasi yang berbeda dari kedua senyawa Natrium ini. Hal tersebut disebabkan oleh karakteristik lapis tipis yang terbentuk berbeda pada tiap-tiap senyawa.

Lapis tipis yang terbentuk oleh Natrium Nitrit pada konsentrasi 0.1% memberikan perlindungan maksimal, hal ini diduga karena sifat ion nitrit yang memiliki pasangan elektron bebas pada atom N mengisi kekosongan pada

orbital d kosong dari permukaan baja karbon. Ikatan sigma (σ) dari NO_2^- terbentuk karena *overlap* orbital sp^2 antara atom N dan O dari 2 ikatan tunggal N-O. Gambar 9 memberikan skema ikatan σ dan adanya pasangan elektron bebas dari ion nitrit

Sama halnya dengan proses adsorpsi oleh NaNO_2 , maka untuk CH_3COONa terdapat satu atom dengan pasangan elektron bebas yang dapat mengisi orbital d kosong pada permukaan baja karbon, namun yang membedakannya adalah keberadaan gugus metil ($-\text{CH}_3$). Gugus metil merupakan gugus pendorong elektron, berarti pada senyawa ini gugus metil akan mengimbas pasangan elektron bebas pada atom O untuk lebih bertumpang tindih dengan orbital d kosong pada permukaan baja karbon.

Kekuatan penempelan lapis tipis dipengaruhi oleh kemampuan senyawa pembentuk lapis tipis untuk mendonorkan pasangan elektron bebasnya ke orbital d kosong pada permukaan baja karbon.

3.6 Pengaruh Potensial Elektroda

Potensial setimbang (E_{stb}), yaitu potensial yang dicapai saat logam berinteraksi dengan pelarutnya dan nilai arus katodik akan sama dengan arus anodik. Pada keadaan ini lah korosi akan terjadi. Saat ditambahkan larutan NO_2^- ke dalam larutan maka E_{stb} awal akan berubah, dalam hal ini $E_{\text{NO}_2^-}^0$ akan memperkecil nilai E_{stb} awal tersebut, sehingga seperti diketahui bahwa E_{stb} yang nilainya lebih kecil daripada E^0 logam (E_M^0) akan bersifat menghambat logam dan memperlambat terbentuknya oksida logam atau terjadi korosi.

4. Kesimpulan

Dari hasil percobaan dapat disimpulkan bahwa temperatur mempunyai pengaruh terhadap laju pembentukan bintik korosi. Semakin tinggi temperatur pada lingkungan sample, semakin cepat juga terbentuknya bintik korosi. Semakin tinggi suhu lingkungan menyebabkan semakin banyak juga molekul air berada pada fasa uapnya. Peningkatan jumlah molekul air dalam fasa uap ini akan menyebabkan jumlah materi lapisan tipis elektrolit pada permukaan material makin bertambah yang pada akhirnya akan mempercepat proses laju korosi.

Mekanisme inhibisi korosi oleh inhibitor anorganik terjadi karena terbentuknya lapis tipis

lapis tipis yang merupakan selaput pelindung terhadap korosi. Lapis tipis ini terbentuk karena adsorpsi senyawa aktif di permukaan logam dan akan membatasi interaksi logam dengan lingkungan larutannya.

Mekanisme pembentukan lapis tipis ini karena adanya tumpang tindih awah elektron orbital d dari logam besi dengan pasangan elektron bebas pada NaNO_2 dan CH_3COOH .

5. Daftar Pustaka

A. ABDUL AZIM and S. H. SANAD (1972), Effects of acid concentration c-content and temperature on the corrosion rate of steel in HCl, Corrosion Science, 1972, Vol. 12, pp. 313 to 324.

Brook, P.A. (1972) Potential pH diagrams at elevated temperatures, Corrosion Science, 1972, Vol 12, pp. 297 to 306.

Dai, Z (1997), Effect of filming corrosion inhibitors an anodic behaviour of armico iron in neutral solution, Materials Protection. Vol. 30, no. 12, pp. 1-3. 1997

F. H. Stott1 dan C. Y. Shih (2000), High-Temperature Corrosion of Iron–Chromium Alloys in Oxidizing–Chloridizing Conditions, Oxidation of Metals, Volume 54, Numbers 5-6, Pages: 425 - 443

Huang, T T; Peterson, B; Shores, D A; Pfender, E (1984), XPS and AES Studies of the High Temperature Corrosion Mechanism of Fe-30Cr Alloy, Corrosion Science. Vol. 24, no. 3, pp. 167-183. 1984

Huheey J.E., Keiter E.A., Keiter R.L., (1999). Inorganic Chemistry : Principles of Structure and Reactivity. Benjamin Cummings, 4th Edition. 91

Jones, D.A. (1992). Principles and Prevention of Corrosion. McMillan Publishing, Co. New York. 28-29, 91-94, 165

Roberge, P.R. (2000). Handbook of Corrosion Engineering. McGraw-Hill. 833-837

Sastri, V.S., and Elboudjaini, M (1996), Surface analysis of inhibitor films formed in hydrogen sulfide medium, Corrosion. Vol. 52, no. 6, pp. 447-452. June 1996

Supardi, Rachmat. (1997). Korosi. PT.Gramedia Pustaka. 67-69, 100-103, 114

Tortorelli, P F dan Natesan, K (1998), Critical factors affecting the high-temperature corrosion performance of iron aluminides, Materials Science and Engineering A. Vol. 258, no. 1-2, pp. 115-125. 31

APPENDIX

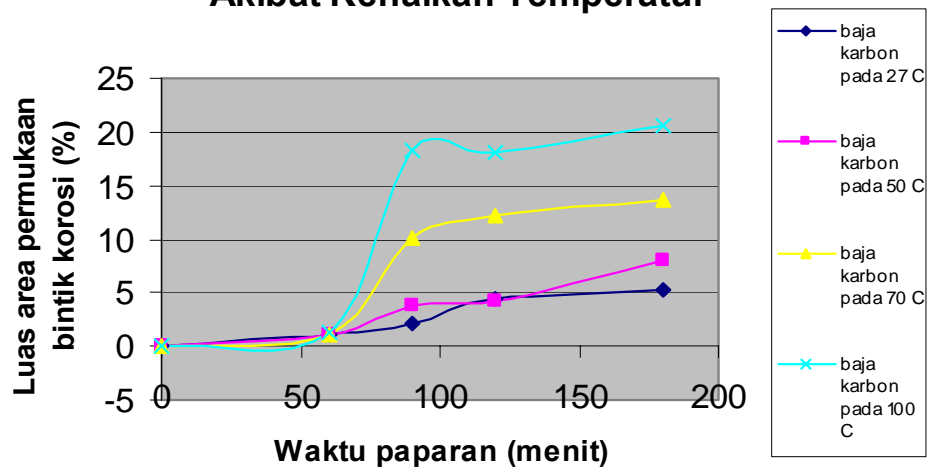
Tabel 1. Pengaruh temperatur terhadap persentase perluasan bintik korosi rata-rata

Waktu paparan (menit)	Persentase perluasan bintik korosi (%) Baja Karbon ASTM 106 Gr B			
	Temperatur 27°C	Temperatur 50°C	Temperatur 70 °C	Temperatur 100 °C
0	0,00	0,00	0,00	0,00
60	1,00	1,00	1,00	1,20
90	2,20	3,75	10,10	18,20
120	4,50	4,20	12,20	18,00
180	5,20	8,00	13,75	20,60

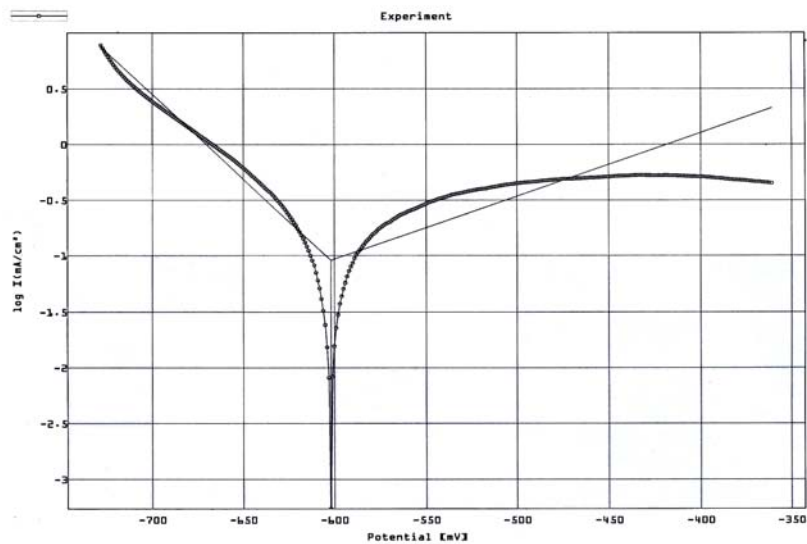
Tabel 2 Nilai Rp dan CR untuk kedua inhibitor pada tiap konsentrasi

Baja karbon	Konsentrasi NaNO ₂ (%)					Konsentrasi CH ₃ COONa (%)				
	0.05	0.1	0.3	0.4	0.5	0.05	0.1	0.3	0.4	0.5
CR (mm/year)	2.784	0.00	0.001	2.544	0.998	0.640	0.001	0.00	0.307	0.015
Rp (kohm.cm ⁻²)	100.93	2200.0	1450.0	109.44	125.72	417.35	138.71	9350.0	121.39	261.79

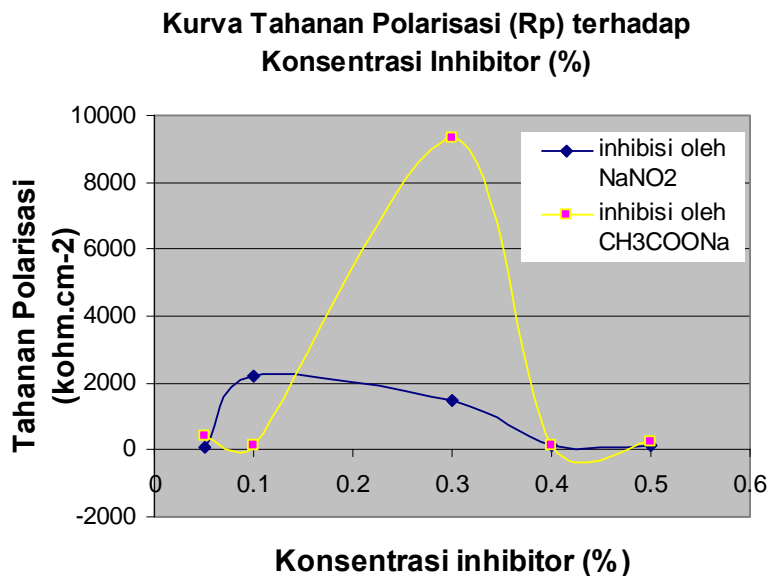
Kurva Pertambahan Luas Bintik Korosi Akibat Kenaikan Temperatur



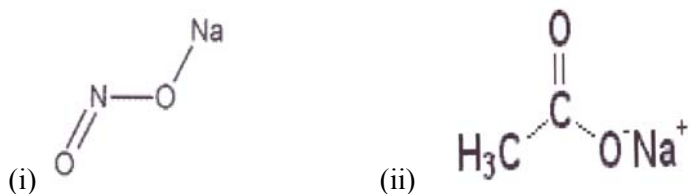
Gambar 1. Pengaruh temperatur terhadap pembentukan bintik-bintik korosi dan perluasannya



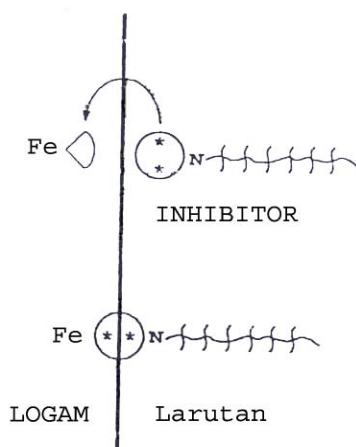
Gambar 2 Salah satu hasil kurva Tafel untuk sampel ASTM 106 Gr B dengan inhibitor NaNO₂



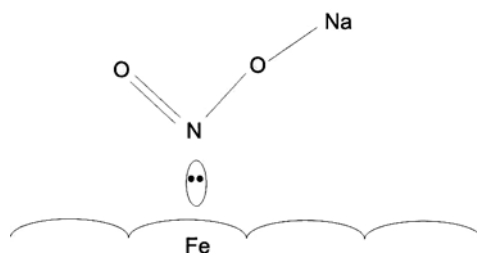
Gambar 3 Aluran kurva tahanan polarisasi terhadap konsentrasi inhibitor



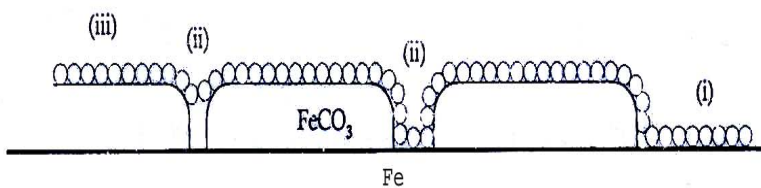
Gambar 4 Struktur Natrium Nitrit (i) dan Natrium Asetat (ii)



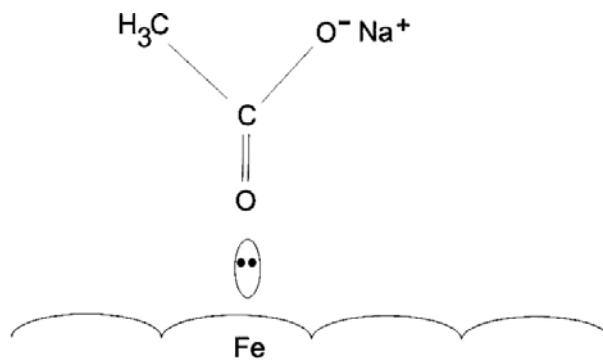
Gambar 5 Skema pembentukan lapis tipis akibat tumpang tindih elektron pada proses adsorpsi oleh elektron bebas inhibitor NaNO₂



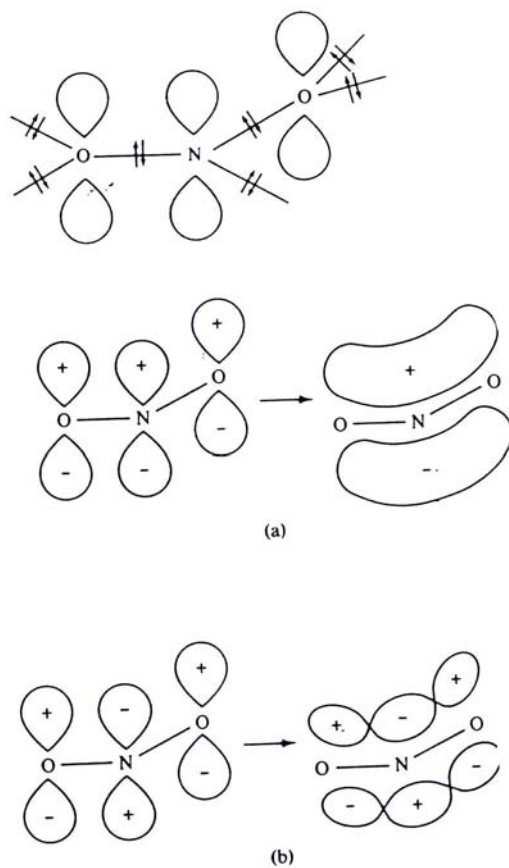
Gambar 6 Adsorpsi NaNO_2 pada permukaan baja karbon



Gambar 7 Skema mekanisme pembentukan lapis tipis pada baja karbon



Gambar.8 Adsorpsi CH_3COONa pada permukaan baja karbon



Gambar 9 Ikatan σ dan pasangan elektron bebas dari ion nitrit

A new investigation of Chrom Azurol S immobilized in XAD-2 by flow analysis method for building copper (II) sensor

Afnidar¹⁾, Musa Ahmad²⁾, Lee Yook Heng²⁾, Rita Sundari²⁾

- 1) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia
Bangi, Selangor, 43600, Malaysia
e-mail: afnidart@yahoo.com
- 2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia
Bangi, Selangor, 43600, Malaysia

Abstract

A reflectance spectrophotometer fiber optic measurements have been undertaken on immobilized chrom azurol S (CAS) in XAD-2 for building copper (II) sensor by flow analysis method. The optimum condition was found at pH 7.0 ($\lambda = 812$ nm) using 0.08 g CAS impregnated in 4.0 g XAD-2. The flow speed has been adjusted to 0.5 ml/min. The working concentration is in the range of 7.5 – 62.5 ppm Cu(II) in aqueous solution. The photostability performance is good with an RSD of 2.54 % for 60 min. running. Regeneration by saturated NaF solution performs successful. This study is a novel investigation that can be applied a valuable contribution for chemical sensor development in the future.

Paper is not available

Studi Pola Pengkelatan Ligan Pirazolil Pada Kompleks Iridium Dikarbonil Dalam Larutan

Agus Abhi Purwoko

Program Studi Kimia, Universitas Mataram
Jl. Majapahit 62, Mataram 83117, Indonesia
aapurwoko2004@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan sintesis kompleks Ir, yakni, hidrotrispirazolilboratoiridium(I) dikarbonil, atau $\text{HB}(\text{Pz})_3\text{Ir}(\text{CO})_2$, Pz = ligan pirazolil, yang telah dilaporkan sebagai aktivator dari ikatan C-H hidrokarbon yang efisien. Dalam laporan itu disebutkan bahwa efisiensi reaksi fotolisis senyawa iridium sangat dipengaruhi oleh karakter struktural molekul ini dalam larutan. Pada studi kali ini kompleks iridium direaksikan dengan asam tetrafluoroborat dietil eter, atau $\text{HBF}_4 \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2$, untuk mempelajari karakter pengkelatan dari senyawa iridium di atas dalam larutan. Data-data spektroskopi yang diperoleh dari UV-Vis dan FTIR dalam larutan disajikan secara lengkap dalam poster ini dan digunakan sebagai identifikasi molekul kompleks induk dan senyawa turunannya, yakni kompleks yang salah satu ligan pirazolilnya telah menangkap proton. Lebih jauh, analisis data-data spektroskopi juga menunjukkan bahwa kompleks $\text{HB}(\text{Pz})_3\text{Ir}(\text{CO})_2$ dalam larutan berbentuk molekul tridentat dan bidentat yang berada dalam keadaan kesetimbangan yang sangat dinamis. Seperti telah dilaporkan sebelumnya bahwa spesies tridentat adalah molekul yang diyakini bertanggung jawab atas efisiensi reaksi fotolisis aktivasi ikatan C-H hidrokarbon. Sementara itu molekul bidentat telah dibuktikan tidak fotoaktif melalui studi fotolisis turunan kompleks iridium dikarbonil lainnya yang memiliki struktur bidentat secara pasti. Analisis kepadatan awan elektron pada molekul tridentat dan bidentat juga memberikan dukungan tambahan bahwa molekul terakhir pada dasarnya adalah molekul yang sangat stabil. Kesimpulan penting dari studi yang disajikan ini adalah bahwa molekul $\text{HB}(\text{Pz})_3\text{Ir}(\text{CO})_2$ dalam larutan memiliki karakter bidentat yang dapat menghasilkan garam kompleks $[\text{HB}(\text{Pz})_2(\text{PzH})\text{Ir}(\text{CO})_2]\text{BF}_4$ dan karakter bidentat inilah yang mengurangi fotoaktifitas senyawa dikarbonil induk dalam larutan.

Kata kunci: iridium dikarbonil, aktivasi ikatan C-H, pirazolil, pengkelatan

Paper is not available

Sintesis Dan Ujian Awal Aktiviti Anti-bakteria Dan Fungi Beberapa Terbitan Benzoiltiourea

Ahamad Sahali Mardi dan Bohari M. Yamin

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Malaysia.
E-mail : asahali@myjaring.net; bohari@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Lapan sebatian terbitan benzoiltiourea, N-benzoil-N'-feniltiourea, 2-klorofenilbenzoiltiourea, 3-klorofenilbenzoiltiourea, 4-klorofenilbenzoiltiourea, 2-iodofenilbenzoiltiourea, 4-bromofenilbenzoiltiourea, 2-klorobenzoil-2-klorofeniltiourea dan N-benzoil-N'-3-nitro-4 klorofeniltiourea telah disintesis dan dicari. Kajian sinar-X menunjukkan semua sebatian tersebut mempunyai konfigurasi cis-trans bagi kedudukan fenil dan benzoil terhadap kumpulan C=S pada ikatan C-N. Para dan ortho isomer benzoiltiourea PhC(O)NHC(S)NHPHX yang mana X = Cl, Br dan I, tidak menunjukkan aktiviti terhadap bakteria *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* dan *Bacillus subtilis*, kecuali m-klorofenilbenzoiltiourea aktif terhadap *Staphylococcus* dan *Salmonella*. Kehadiran NO₂ dalam N-benzoil-N'-3-nitro-4-klorofeniltiourea memberi aktiviti terhadap *Salmonella*. Kehadiran kloro dalam 2-klorobenzoil-2-klorofeniltiourea pula memberi aktiviti terhadap ke empat-empat bakteria. Dalam ujian antifungi, semua fenilbenzoiltiourea yang mempunyai pengganti halida tidak aktif terhadap ke empat-empat jenis fungi diuji. Walau bagaimanapun, N-benzoil-N'-3-nitro-4-klorofeniltiourea dengan kehadiran NO₂ dan kloro dalam kumpulan fenil menunjukkan ada aktiviti ke atas fungi *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Kata kunci : Fenilbenzoiltiourea, antibakteria, antifungi

1. Pendahuluan

Aplikasi terbitan benzoiltiourea meliputi pelbagai bidang termasuklah aktiviti biologi. Sebagai contoh N-[2-(2-klorofenetil)]-N'-[2-(5-bromopiridil)]-tiourea dalam aktiviti immobilisasi sperma, boleh bertindak sebagai penghalang non-nukleosid HIV-1 (D'ruz et al 2000). Beberapa terbitan benzoiltiourea, dilaporkan boleh bertindak sebagai antifungi terhadap patogen tumbuhan dan ini penting untuk mencegah penyakit tanaman (Campo et al 2002). Walau bagaimanapun, jumlah terbitan benzoiltiourea yang tersintesis masih terhad. Oleh yang demikian beberapa sebatian terbitan benzoiltiourea disintesis dan diuji aktiviti terhadap bakteria dan fungi dalam konteks kajian perhubungan struktur-aktiviti.

2. Percobaan

Penyediaan terbitan benzoiltiourea : Terbitan benzoiltiourea disediakan dengan mengrefluks larutan campuran benzoilisotiosianat dengan sebatian amina. Larutan refluks dicurahkan ke dalam ais dan menghasilkan mendak. Mendak dicuci dengan air suling dan metanol. Produk yang kering dihablur semula menggunakan etanol.

Penentuan struktur sinar-X : Hablur tunggal yang dipilih dan sesuai dipasang pada SMART APEX CCD diffraktometer. Data pemalukan dipungut dan diproses menggunakan perisian SAINT (Siemens, 1996). Pembetulan serapan pula menggunakan perisian SADABS (Sheldrick, 1996). Penyelesaian struktur dilakukan secara kaedah terus dengan

menggunakan perisian program SHELXTL versi 5.1 (Sheldrick, 1990).

Ujian mikrobiologi : Untuk ujian potensi biologi sebatian, empat jenis bakteria dan fungi digunakan iaitu *Methicillium resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (60690), *Salmonella thypimurium*(S974), *Bacillus subtilis* (B29) dan

fungi jenis *Candida albican* (CA), *Candida lypolytica* (2075), *Aspergillus ochraceus* (398) dan *Saccharomyces cerevisiae* (20341). Aktiviti antimikrobiologi setiap sebatian ditentukan secara kualitatif menggunakan kaedah cakera peresapan diubahsuai.(Tarafder et al 2000). Luas zon perencatan keliling cakera diukur bagi menentukan tahap keaktifan.

Jadual 1. Inframerah beberapa terbitan arilbenzoiltiourea

Terbitan arilbenzoiltiourea	$\nu(\text{C}=\text{S})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C}=\text{O})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{N}-\text{H})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{C}-\text{N})$ (cm^{-1})
<i>N</i> -benzoi- <i>N'</i> -feniltiourea [Yamin 2003a]	904.76	1534.56	3272.23	1360.84
2-klorofenilbenzoiltiourea [Yamin 2002]	751.85	1516.41	3307.98	1331.25
3-klorofenilbenzoiltiourea	871.59	1530.63	3297.21	1351.82

Jadual 2. ¹H Resonan Magnetik Nukleus beberapa arilbenzoiltiourea

Terbitan arilbenzoiltiourea	$\delta\text{H}(\text{N}1)$	$\delta\text{H}(\text{N}2)$	$\delta\text{H}(\text{fenil})$
<i>N</i> -benzoi- <i>N'</i> -feniltiourea (1)	12.61	11.57	7.43-7.99
<i>o</i> -klorofenilbenzoiltiourea (2)	12.70	11.83	7.32-8.04
<i>m</i> -klorofenilbenzoiltiourea (3)	-	11.67	7.31-7.99
<i>p</i> -klorofenilbenzoiltiourea (4)	12.67	11.65	7.30-7.92
<i>o</i> -iodofenilbenzoiltiourea (5)	12.46	11.79	7.09-8.02
<i>p</i> -bromofenilbenzoiltiourea (6)	12.56	11.65	7.54-7.97

Jadual 3. Peruntukan ¹³C Resonan Magnetik Nukleus beberapa arilbenzoiltiourea dalam d₆-DMSO

Anjakan kimia	Fenil	<i>o</i> -Kloro	<i>m</i> -Kloro	<i>p</i> -Kloro	<i>o</i> -Iodo	<i>p</i> -Bromo
C7	169.5	169.24	168.82	167.26	168.57	168.18
C8	180.45	180.86	179.70	179.20	180.76	179.28
C9	139.68	135.85	140.02	142.00	141.04	137.41
C10	130.03	130.08	123.81	122.28	97.61	128.45
C11	130.29	128.88	129.15	129.98	139.01	132.08
C12	125.30	129.16	124.73	123.58	128.62	118.54
C13	130.29	129.16	133.91	134.71	128.98	132.08
C14	130.03	129.16	130.98	131.21	128.71	128.45
C1/C5	127.69	127.93	126.70	126.89	128.89	126.52
C2/C4	129.42	128.60	129.10	129.88	129.08	128.70
C3	133.63	132.44	132.43	132.67	132.04	131.51
C6	134.71	133.92	133.30	133.78	133.52	133.17

3. Hasil dan Pembahasan

Semua terbitan benzoiltiourea diperoleh sebagai mendakan putih dan stabil di udara dengan hasil sekitar 65 – 80%. Jadual 1, menunjukkan nilai regangan C=O dan getaran C=S. Getaran semua kumpulan berfungsi agak sensitif terhadap jenis dan kedudukan kumpulan pengganti pada gelang aril.

Pada amnya kehadiran halogen pada kumpulan fenil menyebabkan isyarat proton N2 teranjak ke medan rendah (Jadual 2). Kesan terhadap N1 pula tidak demikian, menunjukkan beberapa faktor, lain daripada elektronik beroperasi.

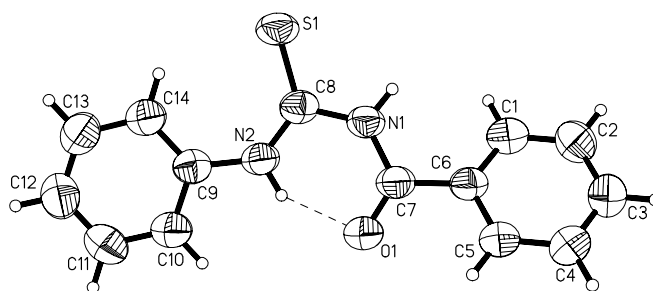
Peruntukan isyarat ^{13}C termasuk kumpulan fenil boleh ditentukan seperti dalam Jadual 3.

Kajian sinar-X menunjukkan tiga ciri penting

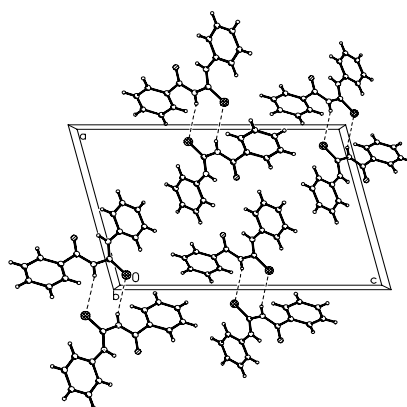
bagi terbitan benzoiltiourea (Rajah 1 dan 2). Pertama, kebanyakan terbitan benzoiltiourea mempunyai kumpulan *cis-trans* bagi kedudukan kumpulan fenil atau aril dan benzoil aril terhadap C=S pada paksi C-N masing-masing.

Kedua, ia mempunyai ikatan intra antara kumpulan karbonil dengan atom hidrogen amina yang membentuk pseudo-gelang 6-ahli. Bilangan ikatan intra dan pseudo-gelang boleh bertambah bergantung kepada kehadiran kumpulan gantian pada fenil atau benzoil. Ketiga, dalam struktur hablur, ikatan hidrogen intra molekul menghubungkan molekul dan bentuk dimer atau polimer selari dengan paksi masing-masing (Rajah 3).

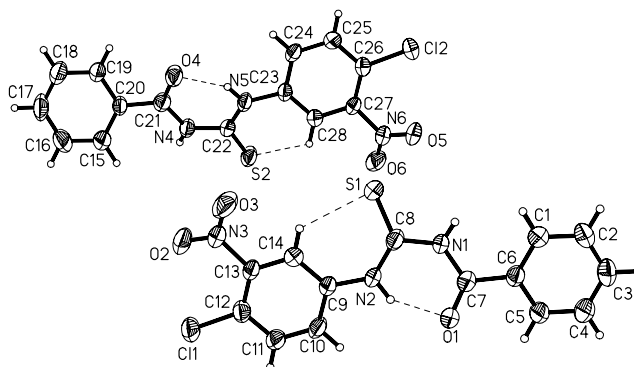
Ujian antibakteria *N*-benzoil-*N'*-feniltiourea, 2-



Rajah 1. Gambarajah ORTEP *N*-benzoil-*N'*-feniltiourea(pada kebarangkalian 50% elipsoid) dengan ikatan hidrogen intramolekul.



Rajah 2. Gambarajah padatan molekul *N*-benzoil-*N'*-feniltiourea yang selari dengan permukaan *ac*.



Rajah 3. Gambarajah ORTEP *N*-benzoil-*N'*-3-nitro-4-klorofeniltiourea (pada kebarangkalian 50% elipsoid) menunjukkan ikatan hidrogen intramolekul.

Jadual 4. Keputusan ujian mikrobiologi antibakteria terbitan fenilbenzoiltiourea

Sebatian arilbenzoiltiourea	MRSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (60690)	<i>Salmonella typhimurium</i> (S 974)	<i>Bacillus subtilis</i> (B 29)
<i>N</i> -benzoil- <i>N'</i> -feniltiourea (1)	-	-	-	-
2-kloro (2)	-	-	-	-
3-kloro (3)	12	-	12	-
4-kloro (4)	-	-	-	-
2-iodo (5)	-	-	-	-
4-bromo (6)	-	-	-	-
3-nitro-4-kloro (7)	-	-	10	-
2-kloro-2-kloro (8)	12	13	14	14
Standard	19	20	15	20

Keputusan dalam unit millimeter (mm). Standard (Streptomycin 10 mikrogram)

MRSA – *Methicillium resistant Staphylococcus aureus*

Jadual 5 : Keputusan ujian mikrobiologi antifungi

Sebatian arilbenzoiltiourea	<i>Candida albican</i> (CA)	<i>Aspergillus ochraceus</i> (398)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (20341)	<i>Candida lypolytica</i> (2075)
<i>N</i> -benzoil- <i>N'</i> -3-nitro-4-klorofeniltiourea (7)	12	-	13	-
2-klorobenzoil-2-klorofeniltiourea (8)	10	-	-	-
Standard	15	16	18	15

Keputusan dalam unit millimeter (mm). Standard (Nystatin 0.5 mikrogram)

kloro, 4-kloro, 2-iodo dan 4-bromo fenilbenzoiltiourea tiada menunjukkan aktiviti terhadap ke empat-empat bakteria. Sebaliknya, 3-klorofenilbenzoiltiourea aktif terhadap 2 jenis bakteria iaitu MRSA dan *Salmonella typhimurium* (Jadual 4). Kehadiran kloro dan nitro dalam kumpulan fenil, *N*-benzoil-*N'*-3-nitro-4-klorofeniltiourea memberi keaktifan terhadap *Salmonella thypimurium*. Kehadiran kloro pada kedudukan *ortho* di kedua-dua

kumpulan fenil, aktif keatas semua jenis bakteria yang diuji.

Ujian antifungi menunjukkan sebatian (1) hingga (6) tidak aktif terhadap fungi jenis *Candida*, *Aspergillus* dan *Saccharomyces*. Sebatian (7) *N*-benzoil-*N'*-3-nitro-4-klorofeniltiourea di dapati aktif terhadap fungi *Candida albican* dan *Saccharomyces*. Berbeza dengan sebatian (8) 2-kloro-benzoil-2-

klorofeniltiourea, hanya aktif terhadap *Candida albican* (Jadual 5).

4. Kesimpulan

Kehadiran kumpulan gantian pada kedua-dua kumpulan fenil dalam benzoiltiourea menunjukkan peningkatan aktiviti antibakteria. Kajian lebih lanjut pada sebatian yang mempunyai kumpulan gantian pada kedudukan *meta* adalah perlu, untuk melihat kesan isomer.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia atas semua kemudahan menjalankan penyelidikan. Ahamad Sahali, mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi, Jabatan Perkhidmatan Awam dan Institut Penyelidikan Teknologi Nuklear Malaysia, kerana memberi bantuan biasiswa dan kelulusan melanjutkan pelajaran.

6. Daftar Pustaka

Campo, R.D., Criado, J.J., Garcia, E., Hermosa, M.R., Sanchez, A.J., Manzano, J.L., Monte, E., Fernandez, E.R. and Sanz, F. (2002). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 89, 1-2, 74-82.

D'cruz *et al* (2000). N-[2-(2-chlorophenethyl)]-N-[2-(5-bromopyridyl)]-thiourea, non-nukleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with sperm-immobilizing activities (SIA), Novel thiourea compound as dual-function microbiology. *Medline*, 63, 1, 196-201.

Sheldrick, G. M. (1990). SHELXTL Version 5.1. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Sheldrick, G. M. (1996). SADABS. Program for empirical absorption correction of area detector data, University of Gottingen, Germany.

Siemens, (1996). SMART and SAINT. Area detector control and integration software. Siemens analytical X-ray systems, Ins., Madison, Wisconsin, USA.

Tarafder M.T.H, Ali, M.A., Saravanan, N., Weng, W.Y., Kumar, S., Umar-Tsafe, Crouse, K.A., (2000). *Transition Met. Chem.* 25. 295.

Yamin, B.M., Yusof, M.S.M., Mardi, A.S. and Kadir, M. *Malaysian Journal Science.* (2002), 1- 5.

Yamin B. M and Yusof M.S.M., *Acta Cryst.*, (2003a). E59, o151-o152.

Yamin B. M. and M.S.M. Yusof, *Acta Cryst.*, (2003b). E59, o340-o341.

Exploration of Thermophilic Microorganism From Hot Springs Around Bandung

Akhmaloka, H. Pramono, E. Susanti, M.R. Moeis, L. Ambasari, A.Suharto, I.N. Tika,
H. Helwati, and F. Madayanti

Departemen Kimia, FMIPA
Institut Teknologi Bandung
email: loka@chem.itb.ac.id

Abstract

Indonesia has the largest volcanic region in the world with over 70 active volcanoes surrounded by hot springs. This condition enables the country to be one of the largest habitats for thermophilic microorganism, however a little effort has been made to characterize those microorganisms. A number of thermophilic microorganisms have been isolated from its habitats. Some of the organisms have been characterized through both conventional and ribotyping method. DNA pol I gene from one of these organism has been cloned and sequenced. The gene showed high homology to DNA pol I from *Bacillus caldolenax*. Heterolog expression of the gene in *Escherichia coli* through *pTRXFus* expression vector showed that the fusion enzyme was expressed at over 35% of cellular protein. The fusion enzyme still exhibited polymerase activity on the crude extract. Purification of the enzyme was carried out by two steps purification, ammonium sulfate fractionation and cation exchange chromatography. A few mutants of the gene have been constructed and expressed in *E.coli*. Biochemical analysis of the enzyme was studied by comparing the properties of the mutants and the wild type.

Key words: thermophile, ribotyping, cloning, thermostable DNA Polymerase.

1. Introduction

Thermophilic microorganism was defined as groups of microorganism which growing at elevated temperature and typically associated with solar, geothermal, industrially or biologically heated environments (Cowan, 1992). The organisms are usually grouped into tree classes, based on their cardinal growth temperature: thermopiles (35 – 70°C), extreme thermopiles (55 – 85°C) and hyper thermopiles (75 – 113°C).

Indonesia is one of the most tectonically active across in the world with over 70 active volcanoes (Kusumadinata, 1979) and a substantial number of geothermal regions. Although Indonesia's diverse terrestrial by geothermal biotopes harbors large number communities of thermophilic organisms. To date a little effort has been made to characterize these thermophilic communities. The deferent on the condition of environmental properties of

each region are possible to isolate high heterogeneity of thermopiles.

Researches on thermophilic microorganisms have extensively been carried out since the organisms offer many advantages both for development of basic sciences and industrial application. Thermophilic microorganisms could be used as sources of thermostable enzymes, which had high potential application for biocatalyst industry. The application of thermostable enzyme on biotechnological process could reduce operational cost and increase the reaction rate and thus increase the productivity (Aquilar et al., 1998). The application of thermophilic microorganisms on the fermentation process also prevents the contamination of other mesophilic bacteria.

One of thermostable enzyme, which have widely used on biotechnological research is DNA polymerase. DNA polymerases are key

enzymes in the replication of cellular information that is present in all living organisms. Beginning with the isolation and characterization of DNA Pol I from *E. coli* (Kornberg, 1980), more than 50 DNA Pol have been cloned and sequenced from various organisms (Kim et al. 2001), including thermophile and archaea. DNA Polymerase has been used extensively in molecular biology. For example, DNA Pol I was used for the nick-translation of DNA and synthesis of the second strand of cDNA in cDNA cloning (Efstratiadis et al., 1976). The modified version of bacteriophage T7 DNA Pol (SequenTM) was used for dideoxy sequencing of DNA (Tabor and Richardson, 1987). Thermostable DNA Polymerase, such as Taq DNA Pol, has been the key element in the development of the polymerase chain reaction (Saiki et al., 1988; Mullis et al., 1986). The application of thermostable DNA Pol in PCR makes the automation of PCR become possible. Tag DNA Pol (from *Thermus aquaticus*) was first characterized thermostable enzyme (Chien, 1976). Thereafter, many of DNA Pol from *Thermus* strain was studied. *Tfl*, *Tth*, *Tfi*, and *Top* Polymerase have been applied to PCR (Kaledin et al., 1981; Ruttimann et al., 1985; Jung et al., 1997; Kim et al., 1998). However, the base-insertion fidelities are low since these DNA Pol do not have 3'→5' exonuclease activity. The high fidelity of DNA Pol, which has 3'→5' exonuclease activity dependent proofreading activity, should be required for error correction during the polymerization. Several thermostable DNA polymerases with proofreading activity (*Pfu*, *Vent*, *Deep Vent*, and *Pwo*) have also been studied and introduced for high-fidelity PCR amplification (Cariello et al., 1991; Lumberg et al., 1991; Kong et al., 1993; Frey and Suppmann, 1995; Chine et al., 1996).

Most of the native thermostable enzymes are synthesized at very low levels by the thermophilic microorganisms; therefore, they are cumbersome to purify. Most of thermostable DNA polymerases were produced in a biologically active form in *E. coli* over-expression system (Lu and Ericson, 1997; Dabrowski and Kur, 1998). However, several problems persist, such as error-prone amplification and unwanted amplification at

low temperature in the PCR amplification. All of commercial available DNA Pols have some advantages and disadvantages properties, therefore a new and improved thermostable DNA Pol are still needed.

A number of thermophilic microorganisms were isolated from hot spring around Bandung. A few of the organisms grow at temperature up to 85°C. Some of these organisms have been identified through ribotyping analysis (Indrajaya et al., 2003; Akhmaloka et al., 2005). DNA Polymerase from one of the isolate have been cloned and sequenced (Pramono et al., 2002). The gene coded 876 amino acids and heterolog expression of the gene still form an active enzyme with polymerase activity.

In this report we would like to give an overview of our recent work on thermophilic microorganisms and its potential application especially on exploration of thermostable DNA polymerase.

Isolation and Identification of Thermophilic Bacteria.

A number of thermophilic bacteria were isolated from hot springs around Bandung, including Domas Crater (Tangkuban Perahu Mount), Cimanggu Hot Spring, Cibumi Hot Spring, Wayang Crater (Pengalengan), Papandayan Crater and Kamojang Crater. Physico-chemistry of the hot spring was variation such as pH, temperature and humidity, however most of them are sulfur rich habitat.

Isolation of the organisms was performed by taken sediment-rich water from surface, middle and bottom of the hot springs. The samples were cultivated on LB, NB, Sulfolobus, *Thermus* and sulfate-reducing media. The isolates were then characterized including, growth temperature, and morphological properties. Some of the isolates grow at temperature up to 85°C and did not shown any growth activity at temperature up to 42°C.

Identification of thermophilic bacteria was performed through analysis of 16S rRNA gene sequence. The 16S rRNA genes were amplified with 27F and 1492R primers (Table1). The amplicons were confirmed by agarose gel electrophoresis. The above primers amplified 1,5 kb of 16S rRNA gene fragment



Figure 1. One of the hot spring at Kamojang Crater.

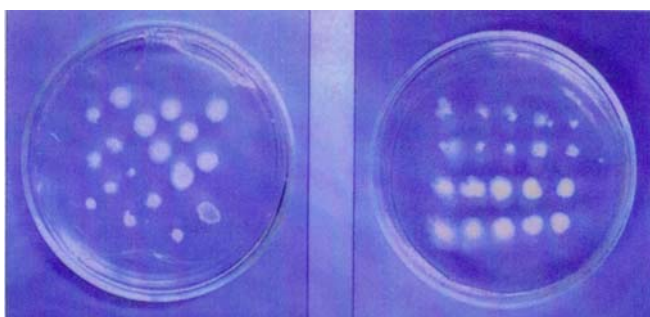


Figure2. Growth of thermophilic bacteria on agar plate at 80°C.



1 μm

Figure 3. Morphological cells under light microscopy with 1000x amplification

respectively. The DNA fragments were ligated on pGEM-T vector and the recombinant plasmid carried DNA fragments were confirmed by restriction analysis.

The chosen plasmids from the result of restriction analysis were sequence based on the strategy as mentioned on Figure 4. At least two independent sequences were used to confirm the correct sequence of the fragments. The resulted sequences were compared to that

available sequence data on the GenBank and the result usually showed that the sequence has high homology to all 16S rRNA genes. This confirmed that the amplicon was a part of 16S rRNA gene. From this alignment could also determine the genus of the organism examined.

Further analyses to identify the strains of organisms, phylogenetic analysis was used to determine the relationship among examined strains. The phylogenetic trees were

Table 1 Primers used in this study. Primers no 1 and 2 were used to amplify 16S rRNA; Primer no 3-9 were used to sequence the 16S rRNA gene

1.	27F	5'-AGAGTTTGATC(A/C) TGGCTCAG-3'
2.	1492R	5'-GGTTAC(G/C) TTGTACCTGCCGGA-3'
3.	357F	5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'
4.	803F	5'-GATTAGATACCCTGGTAG-3'
5.	1114F	5'-GCAACGAGCGCAACCA-3'
6.	909R	5'-CCGTCAATTCATTTGAGT-3'
7.	519R	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'
8.	SP6	5'-GGGCGAATTGGGCCCGAC-3'
9.	T7	5'-TGCATAGCTTGAGTATTC-3'

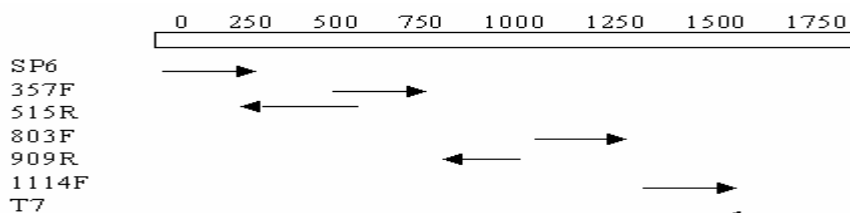


Figure 4. Strategy and Position of Primers to Sequence 16S rRNA Gene

Table 2. Primer used for amplification of DNA Pol I ITB₁

No.	Name	Sequences
1.	FP1	5'-gat ccg aac ctg caa aac att cc-3'
2.	RP1	5'-aat cag ctc gtc atg cac ctg-3'
3.	FP4	5'-gtt ggg aga gcg ttc aag gca agc-3'
4.	RP4	5'-gcg aag gtg tct ggt tct gag g-3'

constructed by Clustal W method from Megalign program from DNA Star. Around 30-50 nucleotide sequences showed highest homology from BLAST program were analysed to construct Phylogenetic tree. In few cases Phylogenetic tree still hard to differentiate the examined strains, further analysis could be performed by detail comparison of 16 S rRNA genes among the highest homology. Using this strategy we were identified *Geobacillus thermoleovorans* as one of examined strain from Wayang Crater (Indrajaya et al., 2003) and a new strain from Papandayan Crater (Akhmaloka et al., 2005).

Cloning and Expression of Thermostable DNA PolII

Coding region of DNA PolII gene from one of thermophilic bacteria was cloned through PCR amplification from its chromosomal DNA as template. To amplify the whole coding region

of the gene, two sets of primers were designed and constructed (Table 2). Determination of primers position was based on the conserved region of DNA Pol I gene (Uemori et al., 1993). Based on this approach, two amino acid sequences were founded highly conserved at position between amino acid number 621 –628 and 828 – 834. The above amino acid sequences were inscripto translated into nucleotide sequences. Furthermore, the sequences were analyzed by Primer Detective Software to determine cross and self-homology, resulting FPI and RPI primers (Table2). The others primers were designed based on the sequence of internal gene.

The FP1 and RP1 primers would amplify around 600 base pairs in the upstream region of the gene, while RP4 and FP4 amplified the entire coding region of the gene (Figure 5). All PCR were performed using standard method.

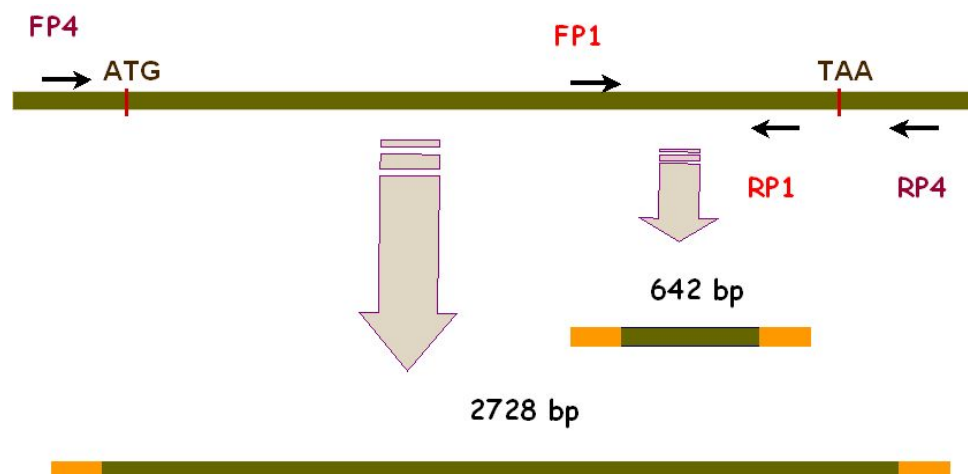


Figure 5. Amplification Strategy and The Primers Position on DNA Pol I gene.

	315	931	1093	1102	1255	1653	1963-1964
<i>Bca</i>	Met ttg	Arg agg	Ala gcc	Gly ggg	Asp gac	Leu ttg	Ser agc
Local Strain	ttg Met 49	aAg Lys 665	gTc Val 827	gAg Glu 836	gTc Val 989	Ctg Leu 1387	aCG Thr 1697-1698
	2040-2042	2645	2657	2795	2921	2930	2948
<i>Bcal</i>	Gln c a a	Ile att	Asn aac	Leu ctg	Tyr tac	Thr aca	Stop taa
Local Strain	□□□	atC Ile 2376	aaA Lys 2388	ctA Leu 2526	taT Tyr 2652	acG Thr 2661	taa Stop 2679

Figure 6. Sequence differences between DNA Pol I *Bca* and DNA Pol I ITB₁.

The PCR product was then assayed on the agarose gel electrophoresis and the bands were visualized using UV light. The results showed that the fragment size were in agreement with the predicted.

All PCR products were cloned on suitable cloning vector and the recombinant plasmids were confirmed by restriction analysis. Further characterization of DNA Pol I fragments were performed by nucleotide sequences analysis. The sequencing was carried out using an automatic DNA sequencer ABI373A. At least three independent clone carrying recombinant

plasmids were carried out resulting on an entire sequence of local DNA Pol ITB₁ gene. The resulted sequence has been compared to GenBank (NCBI) data. Data analysis showed that the sequence was confirmed as DNA Pol I gene, with highest homology to DNA Pol I from *B. caldotenax* (*Bac*, 98%) and *B. stearotherophilus* (*Bst*, 83%). Detail comparison between DNA Pol I ITB₁ to that *B. caldotenax* showed that there was a codon deletion on the downstream of the gene, some missense and silent mutations (Figure 6).

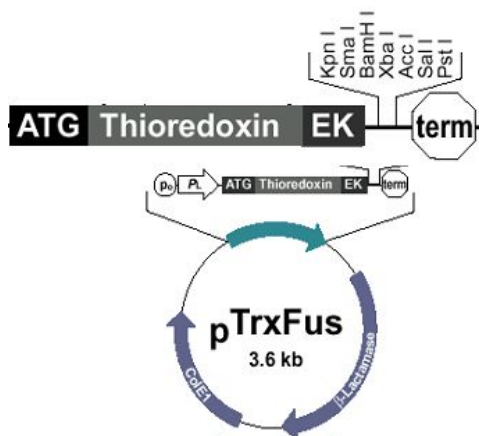


Figure 7. Expression vector used for construction of recombinant plasmid, pITB₉

	481	5	540
predict_h3250	LSSILAEEMFAGVKVDTKRLEQMGEEELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFE		
dpo1_bacca	LSSILAEEMFAGVKVDTKRLEQMGEEELAEQLRTVEQRIYELAGQEFNINSPKQLGVILFE		
dpo1_bacst	LAVLANMEFAGVKVDTKRLEQMGAELEQLQAVERRIYELAGQEFNINSPKQLGTVLF		
dpo1_theaq	LSAVLAHMEATGVRDLVAYLRALSLEVAEEIARLEAEVFRLAGHPFNLSRDQLERVLFD		
dpo1_ecoli	LVPVLSRIERNGVKIDPKVLHNHSEELTLRLAELEKKAHEIAGEEENLSSTKQLQTILFE		
	601	1	660
predict_h3250	KVHTIFNQAL TQTGRLSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVFPSES DWLI FAA DYSQIELR		
dpo1_bacca	KVHTIFNQAL TQTGRLSSTEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVFPSES DWLI FAA DYSQIELR		
dpo1_bacst	KVHTMFNQAL TQTGRLSSVEPNLQNIPIRLEEGRKIRQAFVFPSEPDWLI FAA DYSQIELR		
dpo1_theaq	RLHTRFNQATATATGRLSSDPNLQNIPVVRTPLGQRIRRAFI AEE -GWL LVALDYSQIELR		
dpo1_ecoli	RVHTSYHQAVTATGRLSS TDPNLQNIPVRNEEGRRIRQAFI APE -DYVIVSADYSQIELR		
	661	2	720
predict_h3250	VLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQVSEDEVTPN MRRQAKAVNF GIVYG ISDYG		
dpo1_bacca	VLAHIAEDDNLMEAFRRDLDIHTKTAMDIFQVSEDEVTPN MRRQAKAVNF GIVYG ISDYG		
dpo1_bacst	VLAHIAEDDNLIEAFRRGLDIHTKTAMDIFHVSEEDVTAN MRRQAKAVNF GIVYG ISDYG		
dpo1_theaq	VLAHLSGDENLIRVFQEGRD IHTETASWMPGVPREAVDPL MRRAAKT INF GVL YG MSAHR		
dpo1_ecoli	IMAHLSRDKGLLTAF AEGKDIHRATAAEVFG LPLETVTSE QRRSAKAINF GL IYG MSAFG		
	781	8	840
predict_h3250	FNVRSFAERMA AMNTP IQGSAAD I IKK AMIDLNARLKEERLQARLLL QVHDEL ILEAP KEE		
dpo1_bacca	FNVRSFAERMA AMNTP IQGSAAD I IKK AMIDLNARLKEERLQARLLL QVHDEL ILEAP KEE		
dpo1_bacst	FNVRSFAERT AMNTP IQGSAAD I IKK AMIDLSVRLREERLQARLLL QVHDEL ILEAP KEE		
dpo1_theaq	KSVREAAERMA FNMPVQGTAA DLMKLAMVKLFPLEE--MGAF MLL QVHDEL VLEAP KER		
dpo1_ecoli	GARRAAAEERAA AINAPMQGTAA DIKRAMI AVDAMLQAEQPRV MIHQVHDEL VFEVHKDD		
		6	C

Figure 8. Six conserved region on polymerase domain of DNA POL ITB1

Over expression of DNA Pol ITB₁ was performed through an expression vector pTRXFus. The coding region of DNA Pol ITB₁ was inserted to pTRXFus in position of *KpnI* and *BamHI* cleavage sites. The *KpnI* and *BamHI* sites on the coding region of the gene were introduced by PCR site directed mutagenesis. The new coding sequences were ligated into pTRXFus (Figure 7) vector resulting pITB₉ plasmid with carrying fusion between 3'-terminal of thioredoxin and entire

coding region of DNA Pol ITB1. The pITB₉ plasmid was confirmed by sequence analyses on the junction regions.

The pITB₉ was used to transform *E. coli* GI724, suitable host for the expression vector. For the expression of fusion protein, the culture on RM medium was inoculated to IM media until OD₅₅₀ = 0.5. The cell was induced by addition of tryptophan to activate the promoter. The crude extract of the culture was analysed using SDS-PAGE; the result showed that the

fusion protein was highly expressed on the level around 30-40% of total cellular protein.

Structure-Function Studies of DNA Pol ITB₁
The size of DNA Pol ITB₁ gene is around 2,6 kb encoding 876 amino acids. Comparison of DNA Pol I ITB₁ sequence to that sequences on the GenBank resulted that the protein contained three domains, polymerase 5' → 3', exonuclease 3' → 5', and exonuclease 5'→3', however the exonuclease 5'→3' domain was not contingent. To probe the functioning of each domain, a few deletion mutants were generated to destruct each of the above domains. Deletion mutants were constructed and over expressed in *E.coli*. Constructions of deletion mutant were based on in frame restriction of the open reading frame (ORF) with appropriate restriction enzymes. Two deletion mutants, namely Δ EcoRI and Δ XhoI were inserted on pTRXFus vector. The recombinant vectors still over expressed fusion protein with appropriate size.

In addition of deletion mutants, a few substitution mutants especially on the polymerase region were constructed to give more understanding concerning the catalytic mechanism of polymerase activity. The choice of type and position of amino acids substituted were based on alignment result (Figure 8). DNA Pol ITB₁ has 6 motive-conserved regions on the polymerase domain. Motif 3, 4 and 5 were usually known as A, B and C motif. Asp653, lied on A motif, and Asp830, and Glu831, lied on C motif, were believed to be involved on the catalytic activity on polymerase domain, also known as triad carboxylate.

D802N, and E831Q mutants were constructed through site directed mutagenesis using MEGA primers strategy. The type and position of mutations were confirmed by sequencing on the region. All of the mutant genes still expressed in *E.coli* at high level expression. The mutant enzyme showed an active proteins, especially for polymerase activity, however biochemical analyses of these mutants are still in progress.

Acknowledgment

Akhmaloka thanks to Third World Academic of Sciences, Hibah Bersaing (Dikti) and RUT (KMNRT) for supporting this work.

References

- Aguilar A, Ingemansson T, Magnien E., Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union. *Extremophiles* **2**, 367-373 (1998).
- Akhmaloka, A. Suharto, S.Nurbaiti, I.N. Tika and F.Madayanti (2005). Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater. Proceeding ITB, *Engineering Sciences*, in Press.
- Ambarsari L, H. Pramono, F Madayanti, MR Moeis, and Akhmaloka (2004). Construction and Overexpression of a gene encoding DNA pol I mutant from local thermophilic bacteria. *Jurnal Hayati*, Vol **11**, hal 115-120.
- Baker GC, Gaffar S, Cowan DA, Suharto AR. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot spring, *FEMS Microbiol Lett* **200**, 3-109
- Carelllo, N. F., Swenberg, J. And Skopek, T.R. (1991) Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **19**. 4193-4198.
- Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557.
- Clin, J., Braman, J. and Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Cowan, D.A. (1992) Biotechnology of Archea. *Trends Biotechnol.* **10**. 315-323.
- Dabrowski, S. and Kur, J. (1998) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and *pyrococcus woesei*. *Protein Expression Purif.* **14**. 131-138.
- Efrstatiadis, A., Kafatos, F. C., Maxam. A. M. and Maniatis, T. (1976) Enzymatic in vitro synthesis of globin gene. *Cell* **7**, 279.
- Frey, B. and Suppmann, B. (1995) Demonstration of the expend PCR systems greater fidelity and higher yields with a lacI-based fidelity assay, *Biochemica* **2**, 34-35.
- Indrajaya, F Madayanti, and Akhmaloka (2003). Isolation and Identification of Thermophilic Microorganisms from Wayang Crater. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **8**: 53-56.
- Jung, S. E., Choi, J. J., Kim, H. K. and Kwon, S. T. (1997) Cloning and analysis of DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Molecules and Cell* **7**, 769-776.

- Kaledin, A. S., Sliusarenko, A. G., and Gorodetskii, S. I. (1981) Isolation and Properties of DNA polymerase from the extreme thermophilic bacterium *Thermus Falvus*. *Biokimiia* **46**, 1576-1584.
- Kim, B. C., Grite, R., Lee, D.W., Antranikian, G. and Pyun, Y. R. (2001). *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. Nov., a novel extreme thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85°C. *Int.J.Sys. Evol. Microbiol.* **51**, 1539-1548.
- Kim, J. S., Koh, S., Kim, J. J., Kwon, S. T., and Lee, D. S. (1998) Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB 27: Gene cloning, sequence determination, and physicochemical properties. *Molecules and Cell* **8**, 157-161.
- Kong, H., Kucera, R.B. and Jack, W. E. (1993) Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* **268**, 1965-1975.
- Kusumadinata, *Catalogue of References on Indonesian Volcanoes with Eruptions in Historical Time*. Department of Mining and Energy (1977).
- Lu, C. and Ericson, H. P. (1997) Expression in *Escherichia coli* of the thermostable DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Expression Purif.* **11**, 179-184.
- Lunberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. and McArthur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Mullis, K., Falooma, F., Saiki, R., Horn, G. And Ehrlich, H. (1986) Specific enzyme amplification of DNA in Vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **247**, 7116-7122.
- Pramono, H., Akhmaloka, D. S. Retnoningrum, K. Padmawinoto dan O. B. Liang (2002). Kloning dan Penentuan Urutan Nukleotida Fragmen-Fragmen Gen DNA Polimerase *Bacillus thermoleovorans* Isolat Lokal. *Acta Biochim Indo.*, Vol 26, hal. 155-162.
- Ruttiman, C., Cotoras, M., Zaldivar, J. and Vicuna, R. (1985) DNA polymerase from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thrmophilus* HB. *Eur. J.Biolchem.* **149**, 41-46.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., D.W. Russel, (2001), *Molecular Cloning*, Third Edition, CSHL Press, New York.
- Tabor, S. and Richarsson, C/ C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4767.

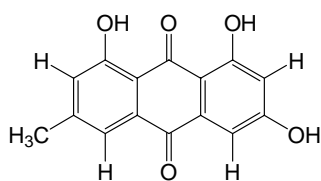
Isolasi Senyawa Antrakuinon dari *Cassia multijuga* (Leguminosae)

Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, Mulyadi Tanjung, Yusamsutin, Azizah, and
Dahlia Safa Marwati

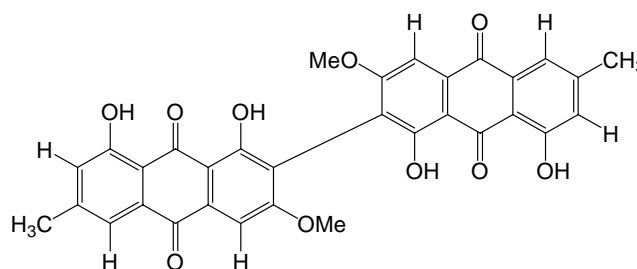
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga
Kampus C UNAIR, Jl. Mulyorejo Surabaya, Indonesia, 60115
E-mail : nanik_sa2000@yahoo.com

Abstract

Two anthraquinone compounds emodin (1) and biphyscion (2) have been isolated from the ethyl acetate extract of the stem bark of *Cassia multijuga* (Leguminosae). The structures of these compounds were determined on the basis of spectroscopic evidence.



(1)



(2)

Keywords: *Cassia multijuga*, emodin, biphyscion, Leguminosae

1. Pendahuluan

Leguminosae merupakan salah satu famili tumbuhan yang sangat besar dan banyak tumbuh di Indonesia. Famili tumbuhan ini telah dilaporkan merupakan salah satu famili tumbuhan penghasil senyawa fenolik yang kaya akan gugus hidroksil khususnya golongan oligostilbenoid. Senyawa oligostilbenoid tersebut telah dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas biologis yang sangat menarik, seperti antioksidan (Tanaka, 2000), anti-HIV (Dai, 1998), antibakteri (Sultanbawa, 1987; Geewananda, 1986), antifungal (Pryce, 1977; Bokel, 1988), antihepatotoksik (Oshima, 1993), antiinflamasi (Kitanaka, 1990), sitotoksik (Dai, 1998; Ito, 2001) inhibitor enzim 5 α -reduktase (Hirano, 2001), dan enzim asetilkolinesterase (Sung, 2002). Selain senyawa oligostilbenoid,

dari tanaman-tanaman tersebut dilaporkan juga adanya senyawa fenolik seperti flavonoid dan antrakuinon yang tidak kalah menariknya baik dari segi struktur kimia maupun khasiatnya.

Senna/Cassia merupakan salah satu genus dari famili Leguminosae yang mempunyai banyak keanekaragaman, baik dari morfologi, taksonomi maupun kandungan kimianya. Beberapa senyawa yang telah berhasil diisolasi dari genus *Cassia/Senna* adalah senyawa golongan stilbenoid, antrakuinon dan flavonoid. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaporkan memperlihatkan bahwa senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari beberapa spesies dari genus *Senna/Cassia* tersebut mempunyai beberapa aktivitas biologis yang menarik.

Senna/Cassia multijuga merupakan salah satu spesies dari genus *Senna/Cassia* yang telah diteliti sebagian. Biji dari tumbuhan ini dilaporkan menghasilkan senyawa monomer dalam bentuk hidroksi maupun glikosida dari senyawa golongan antrakuinon (Singh, 1981). Namun bagian kulit batang dari tanaman ini belum pernah diteliti sebelumnya. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan isolasi, identifikasi (dengan metode spektroskopi seperti UV, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$), uji aktivitas antioksidan dan toksisitasnya pada benur udang *Artemia salina* terhadap senyawa-senyawa yang terkandung dalam kulit batang *Senna/Cassia multijuga*.

Penentuan aktivitas antioksidan dengan panduan TLC-autografi merupakan metode yang efektif dan cepat untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas dalam bahan ekstrak. Interaksi antara senyawa aktif dengan pereaksi radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil) akan memberikan warna kuning. Selanjutnya dengan metode spektrometri senyawa murni yang mempunyai aktivitas antioksidan ditentukan IC_{50} berdasarkan prinsip bahwa senyawa aktif dapat meredam puncak absorbansi radikal DPPH. Penelitian senyawa anti radikal bebas merupakan penelitian pendahuluan yang selanjutnya akan diaplikasikan dalam terapi kanker dan atherosclerosis. Uji toksitas menggunakan Brine shrimp lethality test (BSLT) juga dilakukan untuk mengetahui toksisitas senyawa yang diperoleh.

2. Percobaan

Bahan penelitian :

Serbuk kulit batang tumbuhan *Senna multijuga* yang diperoleh dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.

Bahan Kimia :

Metanol, aseton, n-heksana, kloroform, etil asetat, benzena, eter, magnesium sulfat anhidrat, akuades, pelat silika gel GF₂₅₄, silika gel GF₆₀, silika gel GF₂₅₄, pereaksi cerium sulfat, pereaksi DPPH, dan *sea salt* (garam laut). Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk keperluan ekstraksi adalah yang berkualitas teknis dan sudah didestilasi sedangkan untuk keperluan analisis dan

pemurnian digunakan bahan yang berkualitas pro analisis (p.a).

Alat-alat penelitian :

Seperangkat alat kromatografi kolom cair vakum, seperangkat alat kromatografi kolom cepat, seperangkat alat destilasi, seperangkat alat penguap putar, bejana kromatografi lapis tipis, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Alat-alat yang digunakan untuk identifikasi adalah : *Fisher Johns melting point apparatus*, spektrofotometer UV-VIS Beckman DU 7500, $^1\text{H-RMI}$ Bruker AM 300, dan $^{13}\text{C-RMI}$ Bruker AM 400.

Cara Kerja :

1. Penyediaan bahan penelitian

Sampel tanaman yang berupa kulit batang *Senna multijuga* dibersihkan dari pengotornya, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Setelah itu dipotong-potong dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk.

2. Ekstraksi dan isolasi senyawa fenolik

Serbuk kulit batang *Senna multijuga* sebanyak 4 kg dimaserasi menggunakan pelarut aseton selama 3 x 24 jam sebanyak tiga kali pada suhu kamar. Kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Ekstrak aseton yang diperoleh, disaring dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya ditambahkan air sebanyak 10% dari volume semula. Kemudian diekstraksi dengan n-heksan sebanyak tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa antrakuinon dan senyawa semi polar lainnya. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dikeringkan menggunakan magnesium anhidrat selama 24 jam kemudian disaring dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh ekstrak etil asetat kental.

Selanjutnya, terhadap ekstrak etil asetat fraksi dilakukan pemisahan dan pemurnian dengan berbagai teknik kromatografi, meliputi kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom gravitasi (KKG), dan kromatografi kolom cepat (KCC). Proses pemisahan dengan kromatografi di atas dilakukan berulang kali sampai diperoleh satu noda pada plat KLT. Fraksi dengan satu noda yang diperoleh dari

proses pemisahan, selanjutnya dimurnikan melalui proses rekristalisasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda, uji titik leleh dan analisis spektroskopi.

3. Identifikasi Senyawa fenolik

Senyawa yang diperoleh ditentukan titik lelehnya dengan menggunakan *melting points Fisher Johns apparatus*. Kemudian dilanjutkan dengan analisis spektroskopi yang meliputi UV – Vis, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$

4. Uji Antioksidan (TLC-Autografi dan Spektrometri)

Uji dilakukan dengan menggunakan larutan DPPH

5. Uji toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji dilakukan dengan menggunakan telur *Artemia salina* Leach.

3. Hasil dan Diskusi

Berdasarkan serangkaian proses yang telah dilakukan terhadap fraksi etil asetat, berhasil diperoleh dua senyawa fenolik golongan antrakuinon. Kedua senyawa tersebut terdiri atas satu monomer antrakuinon yang dikenal dengan nama emodin (**1**) dan satu dimer antrakuinon yaitu 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon (**2**).

Senyawa (**1**) yang diperoleh berupa serbuk berwarna kuning sebanyak 70 mg dengan titik leleh = 142°C (terurai).

Spektrum UV-Vis memperlihatkan serapan maksimum pada $\lambda_{\text{maks (MeOH)}}$ 206, 282, dan 448 nm. Efek batokromik dengan penambahan NaOH memperlihatkan serapan maksimum

pada $\lambda_{\text{maks (MeOH)}}$ 307, 401, dan 521 nm.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (aseton- d_6) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ (ppm) 2,43(3H, s), 6,62(1H, d, $J=1,5$ Hz), 7,08(1H, s), 7,19(1H, d, $J=1,5$ Hz), 7,50(1H, s), 9,74(1H, s), 12,02(1H, s), dan 12,14(1H, s).

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (aseton- d_6) memberikan harga pergeseran kimia pada δ (ppm) 21,8; 108,8; 108,8; 109,7; 121,4; 124,9; 134,2; 136,4; 136,9; 149,5; 163,2; 166,2; 166,4; 182,2; dan 191,7.

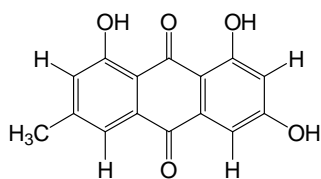
Senyawa (**2**) berupa serbuk berwarna orange sebanyak 32 mg dengan titik leleh $>300^\circ\text{C}$.

Spektrum UV-Vis memperlihatkan $\lambda_{\text{max (MeOH)}}$ (nm) 208, 270, 351, 446, dan 516. Sedangkan $\lambda_{\text{max (MeOH + NaOH)}}$ (nm) 211, 270, 390, 512, dan 520.

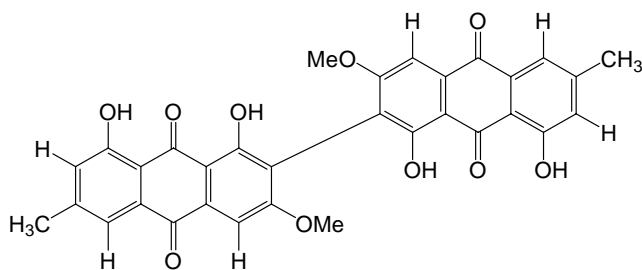
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ (ppm) 2,33(s, 3H), 2,45(s, 3H), 3,81(s, 3H), 3,86(s, 3H), 6,79(s, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,06(s, 1H), 7,39(s, 1H), 7,52(s, 1H), 7,64(s, 1H), 12,04(s, 1H), 12,08(s,1H), 12,25(s, 1H), dan 13,02(s, 1H).

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) memberikan harga pergeseran kimia pada δ (ppm) 22,1; 22,2; 56,5; 56,6; 103,6; 104,6; 110,5; 111,0; 113,5; 113,8; 117,4; 120,1; 121,2; 123,9; 124,4; 132,4; 133,3; 133,8; 134,2; 161,2; 162,1; 162,4; 163,3; 164,7; 166,1; 182,2; 182,6; 190,9; dan 191,3.

Senyawa (**1**) diperoleh melalui tahapan sebagai berikut : Fraksi etil asetat sebanyak 63 g dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Guna memudahkan proses selanjutnya, fraksi ini dibagi dua yaitu 43 g dipisahkan dengan KKG₁ dan sisanya (20 g) dengan KKG₂ dengan eluen n-heksan-aseton (9,5:0,5). Proses pemisahan ini menghasilkan



(1)



(2)

23 fraksi dari KKG₁ dan 14 fraksi dari KKG₂ dan masing-masing dikelompokkan menjadi 4 gabungan fraksi (A, B, C, dan D). Tiap-tiap fraksi diuji dengan KLT dan hasil uji menunjukkan bahwa fraksi A (400 mg) dari KKG₁ dan B (190 mg) dari KKG₂ memperlihatkan harga R_f yang sama. Fraksi A dan B digabung, kemudian dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom modifikasi sebanyak dua kali dengan eluen n-heksan-aseton (9:1) dan n-heksan-kloroform (1:1) sehingga didapatkan 4 fraksi (E, F, G, dan H). Fraksi G (80 mg) dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen n-heksan-etil asetat (9:1) dan hasil uji KLT menunjukkan bahwa fraksi (6-19) mempunyai spot tunggal. Gabungan fraksi dengan spot tunggal ini selanjutnya diuji dengan KLT menggunakan tiga sistem eluen yang berbeda untuk menunjukkan kemurniaan senyawa. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa senyawa (**1**) yang berhasil diisolasi adalah senyawa tunggal.

Spektrum UV-Vis memberikan serapan pada λ_{maks} yang khas untuk senyawa golongan antrakuinon yaitu 3 atau 4 pita muncul pada λ_{maks} 215 dan 300 nm dan 1 pita lainnya pada λ_{maks} diatas 430 nm (Harborne, 1987). Adanya efek batokromik setelah penambahan NaOH (sekitar 25 nm) menunjukkan bahwa senyawa (**1**) mempunyai gugus hidroksi benzen (fenolik) (Harborne, 1987).

Spektrum ¹³C-NMR memperlihatkan adanya 12 sinyal yang mewakili 15 atom karbon. Lima belas atom karbon tersebut terdistribusi ke dalam : 9 atom karbon aromatis ($\delta = 108,8; 108,8; 109,7; 121,4; 124,9; 134,2; 136,4; 136,9; \text{ dan } 149,5$ ppm), 2 atom karbon karbonil ($\delta = 182,2; \text{ dan } 191,7$ ppm), 3 atom karbon oksiaril ($\delta = 163,2; 166,2; \text{ dan } 166,4$ ppm), dan 1 atom karbon metil ($\delta = 21,8$ ppm). Berdasarkan data tersebut, diduga bahwa senyawa (**1**) adalah suatu monomer antrakuinon yang mengikat 3 gugus hidroksil dan 1 gugus metil.

Dugaan tersebut diperkuat oleh data ¹H-NMR yang memperlihatkan adanya 4 sinyal proton aromatik pada pergeseran kimia (δ) 7,08(1H, s, H-2), 7,50(1H, s, H-4), 7,19(1H, d, J=1,5 Hz, H-5), dan 6,62(1H, d, J=1,5 Hz, H-7). Proton H-2 yang terletak diantara 2 gugus OH kurang deshielding dibanding proton H-4 yang terletak

di antara karbon yang mengikat metil dan karbon kuartener. Adanya 2 sinyal proton masing-masing doublet pada δ 6,62 dan 7,19 ppm dengan J= 1,5 Hz menunjukkan bahwa posisi proton aromatik tersebut pada posisi meta. Di samping itu juga terdapat 3 sinyal proton hidroksi pada δ 9,74(1H, s), 12,02(1H, s), dan δ 12,14(1H, s) serta satu sinyal proton singlet yang mewakili 3 proton dari substituen metil pada δ 2,43(3H, s).

Untuk memastikan adanya kopling meta dari dua sinyal proton aromatik yang ada dilakukan pengukuran spektrum 2D ¹H-¹H COSY. Sedangkan pengukuran spektrum 2D ¹³C-¹H COSY digunakan untuk mengetahui hubungan antara proton dan karbon 1 ikatan. Dari spektrum ini terlihat bahwa atom karbon pada δ 21,8 ppm (CH₃) berikatan dengan 3 atom H pada δ 2,43 ppm, atom karbon pada δ 124,9 ppm (C-4) berikatan dengan atom H pada δ 7,50 ppm, dan atom karbon pada δ 134,2 ppm (C-2) berikatan dengan atom H pada δ 7,08 ppm. Di samping itu juga diketahui bahwa atom C pada δ 108,8 ppm berikatan masing-masing dengan 1 atom H pada δ 7,19 ppm (H-5) dan atom H pada δ 6,62 ppm (H-7).

Kesimpulan terhadap struktur senyawa (**1**) telah dibandingkan dengan literatur (Meselhy, 2003 dan Lee, 2001).

Senyawa (**2**) diperoleh lewat tahapan sebagai berikut : Sebanyak 100 g fraksi etil asetat sisa dipisahkan dengan KCV menggunakan eluen heksan:etil asetat dengan meningkatkan gradien kepolaran dan diperoleh 4 kelompok fraksi (A, B, C, dan D), Fraksi B (900) mg dipisahkan lebih lanjut dengan lima kali kromatografi kolom cepat menggunakan eluen berturut-turut n-heksan : aseton(9:1), n-heksan : etil asetat (9:1),n-heksan : aseton (95:5), n-heksan:kloroform (1:1), dan n-heksan-etil : asetat (9:1) menghasilkan senyawa (**2**) berupa serbuk berwarna orange sebanyak 32 mg. Hasil uji KLT dengan tiga sistem eluen [Heksan:aseton (8:2); Heksan:kloroform (9:1); Heksan:etilasetat (8:2)] tersebut menunjukkan bahwa senyawa (**2**) merupakan senyawa tunggal dan sudah murni.

Analisis spektrum UV-Vis memberikan serapan λ_{maks} yang merupakan karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antrakuinon.

Tabel 1 : Hubungan antara proton dan karbon pada spektrum ^1H - ^1H COSY

No karbon	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	^1H - ^1H COSY
1	163,2	12,02 (1H, s)	-
2	134,2	7,08 (1H, s)	-
3	149,5	-	-
4	124,9	7,50 (1H, s)	-
5	108,8	7,19 (1H, d, J=1,5 Hz)	H-5/-7
6	166,4	9,74 (1H, s)	-
7	108,8	6,62 (1H, d, J=1,5 Hz)	H-7/-5
8	166,2	12,14 (1H, s)	-
9	191,7	-	-
10	182,2	-	-
11	136,9	-	-
12	109,7	-	-
13	121,4	-	-
14	136,9	-	-
6-CH ₃	21,8	2,43 (1H, s)	-

Karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antrakuinon dapat dibedakan dari kelas kuinon lainnya karena mempunyai empat atau lima pita serapan didaerah UV dan daerah tampak. Tiga dari pita serapan tersebut terletak antara 215 dan 300 nm, dan serapan yang satu lagi diatas 430 nm (Harborne, 1987). Sedangkan adanya pergeseran batokromik setelah penambahan NaOH sekitar 4-30 nm (λ_{max} 254, 255, 377, dan 517) menunjukkan bahwa senyawa (**2**) mempunyai gugus hidroksi fenolik.

Analisis spektroskopi karbon NMR (^{13}C -NMR) dalam pelarut CDCl_3 memperlihatkan adanya 32 sinyal yang mewakili 40 atom karbon. Sinyal-sinyal karbon tersebut terdistribusi sebagai : empat sinyal karbon karbonil pada $\delta = 182,2; 182,6; 190,9; \text{ dan } 191,3$ ppm, 24 sinyal karbon aromatik yang mewakili 30 karbon pada $\delta = 103,6; 104,6; 110,5; 111,0; 113,5; 117,4; 120,1; 121,2; 123,9; 124,4; 132,4; 133,3; 133,8; 134,2; 161,2; 162,1; 162,4; 163,3; 164,7; \text{ dan } 166,1$ ppm, dua sinyal karbon metoksi pada $\delta = 56,5$ dan $56,6$ ppm, dan dua karbon dari gugus metil pada $\delta = 22,1$ dan $22,2$ ppm. Dengan demikian dapat diduga bahwa senyawa tersebut merupakan dimer antrakuinon yang masing-masing monomernya mengikat dua gugus hidroksi, satu gugus metil dan satu gugus metoksi.

Data ini didukung oleh data spektrum ^1H -NMR yang memperlihatkan adanya proton dengan perincian: empat sinyal proton hidroksi pada $\delta 12,04; 12,08; 12,25$ dan $13,02$ ppm (masing-masing s); dua sinyal proton alifatik yang

mewakili 6 proton dari gugus metoksi pada $\delta 2,33$ (s, 3H) dan $2,45$ ppm (s, 3H); dua sinyal proton mewakili 6 proton dari gugus metoksi pada $\delta 3,81$ (s, 3H) dan $3,86$ ppm (s, 3H); serta 6 sinyal proton aromatik pada $\delta 6,79, 7,02, 7,06, 7,39, 7,52, 7,64$ ppm (masing-masing s).

Sedangkan pengukuran 2D ^{13}C - ^1H COSY digunakan untuk mengetahui hubungan antara proton dan karbon satu ikatan. Dari spektrum ini terlihat bahwa karbon pada $\delta 22,1$ ppm (CH_3) berikatan dengan 3 proton pada $\delta 2,33$ ppm dan karbon pada $\delta 22,2$ ppm (CH_3) dengan 3 proton $\delta 2,45$ ppm, karbon pada $\delta 56,5$ ppm (OCH_3) berikatan dengan 3 proton pada $\delta 3,81$ ppm dan karbon pada $\delta 56,6$ ppm (OCH_3) dengan 3 proton $\delta 3,86$ ppm, karbon pada $\delta 103,6$ ppm berikatan dengan proton pada $\delta 7,52$ ppm (H-5), karbon pada $\delta 104,6$ ppm berikatan dengan proton pada $\delta 6,79$ ppm (H-7), karbon pada $\delta 121,2$ ppm berikatan masing-masing dengan proton pada $\delta 7,39$ (H-3') dan $7,64$ ppm (H-1''), karbon pada $\delta 123,9$ ppm berikatan dengan proton pada $\delta 7,02$ ppm (H-8'), dan karbon pada $\delta 124,4$ ppm berikatan dengan proton pada $\delta 7,06$ ppm.

Berdasarkan data spektrum UV-Vis, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR dan ^{13}C - ^1H COSY dapat disarankan bahwa senyawa (**2**) adalah 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2 (fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon.

Hasil Uji Bioaktivitas

Uji aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH senyawa hasil isolasi dilakukan pada

konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Pengukuran pada spektrofotometer UV-Vis dilakukan setelah 5 menit penambahan sampel. Hasil pengukuran dan penghitungan % peredaman DPPH senyawa antrakuinon hasil isolasi adalah : IC_{50} emodin = 200 ppm sedangkan IC_{50} 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon = 1.305 ppm

Berdasarkan data tersebut diatas, terlihat bahwa monomer antrakuinon memiliki aktivitas antioksidan yang jauh lebih tinggi dibanding dimer antrakuinon. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila harga $IC_{50} < 1000$ ppm.

Uji toksisitas dengan benur udang *Artemia salina* (BSLT)

Terhadap senyawa hasil isolasi juga dilakukan uji toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina*. Pada larutan sampel dibuat 4 macam variasi konsentrasi dan masing-masing konsentrasi dibuat 3 kali replikasi. Setelah 24 jam, jumlah benur udang yang mati pada masing-masing konsentrasi larutan sampel dan larutan kontrol dihitung, dicatat, dan ditentukan % kematian. Data tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan LC_{50} dengan menggunakan analisis probit program SPSS. Suatu senyawa dikatakan memiliki toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina* apabila harga $LC_{50} < 1000$ ppm. Hasil uji toksisitas senyawa hasil isolasi terhadap benur udang *Artemia salina* adalah : LC_{50} emodin = 173,65 ppm, sedangkan LC_{50} 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon = 31,25 ppm

Emodin dan 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon menunjukkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina* ($LC_{50} < 1000$ ppm).

4. Kesimpulan

Dua senyawa golongan antrakuinon, yaitu emodin dan 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon telah berhasil diisolasi dari kulit batang *Senna multijuga*.

Emodin menunjukkan aktivitas antioksidan ($IC_{50} = 200$ ppm) dan 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon tidak menunjukkan aktivitas antioksidan.

Kedua senyawa hasil isolasi menunjukkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina*, yaitu emodin ($LC_{50} = 173,65$ ppm) dan 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2-(fiscion-2'-il)-9,10-antrakuinon ($LC_{50} = 31,25$ ppm).

5. Daftar Pustaka

- Cos, P.; Ying, P.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Berghe, D.P., 1998, Structure Activity Relationship and Classification of flavonoid as Inhibitor of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers, *J. Nat. Prod.*, **61**, 71-76
- Dai, J.R.; Hallock, Y.F.; Cardellina II, J.H.; Boyd, M.R., 1998, HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 351-353
- Geewananda, Y.A.; Gunawardena, P.; Sotheeswaran, S.; Sultanbawa, M.U.S.; Surendrakumar, S.; Bladon, P., 1986, Another antibacterial polyphenol, coppaliferol B from *Vateria copallifera* (Dipterocarpaceae), *Phytochemistry*, **25**, 1498-1500
- Harborne, J. B., 1987, Metode Fitokimia. Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, ITB, Bandung
- Joyeux, M.; Lobstein, A.; Anton, R.; Mortier, F., 1995, Comparative Antilipoperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Terpenes and Biflavones from Ginko and some Flavonoids, *Planta Medica*, **61**, 126-129
- Meselhy, R., 2003, Constituents from Moghat, the Roots of *Glossostemon Bruguieri* (Desf.), *Molecules*, **8**, 614-621
- Lee, C.K.; Lee, P.H.; Kuo, Y.H., 2001, The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L., *J. Chinese Chem. Soc.*, **48**, 1053-1058
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L., 1982, Brine shrimp : a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta medica*, **45**, 31-34
- Singh, J.; Tiwari, A.R.; Tiwari, R.D., 1981, Anthraquinones and Flavonoids of *Cassia laevigata* Roots, *Phytochemistry*, **19**, 1253-1254

Bacterial Community Analysis of Gedongsongo Hot Spring: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

A.L.N. Aminin^{1,2}, M. Asy'ari¹, N.S. Mulyani¹, F. Madayanti², P. Aditiawati³, and Akhmaloka²

Department of Chemistry, Diponegoro University¹; Department of Chemistry² and Biology³, Institut Teknologi Bandung,

Abstract

The bacterial communities from one of hot spring at Gedongsongo (WGS2) Ambarawa, Central Java, Indonesia; was investigated by molecular analysis based on the 16S rRNA gene. Two minimal media, MM₁ and MM₂ were used for growth of aerobic microbial communities. Cultures media were combined by filtration through 0.2- μ m-pore-size filter for total genomic DNA extraction. The DNA that was extracted both from cells of filtration and cultures have been well characterized as microbial chromosomal DNA and used as PCR template. Partial 16S rRNA gene sequences were PCR amplified using one primer set. One primer complements a region conserved among members of the domain Bacteria (Escherichia coli positions 1055 to 1070. The other primer is based on a universally conserved region (E. coli positions 1392 to 1406 and incorporates a 40-base GC clamp. These primers amplified a 323-bp section of the 16S rRNA genes. The amplicons were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for community analysis. The DGGE profiles showed that there were three distinct bands, but only two of them that represent the predominant bacteria.

1. Introduction

Biotechnologists have been searching for microorganisms that can function in extreme environments to enable the creation of new processes and industries. A number of thermophiles and hyperthermophiles have been isolated from samples of hot sediments, mud, rocks, soils and waters. The classical approach to determine the microbial diversity in a natural or artificial ecosystem starts with culturing of the microorganisms in a sample. Culture based approaches to isolate microorganisms from any natural environment do not provide comprehensive information on the composition of microbial communities. This technique also failed to determine the majority of microorganisms in nature typically are not cultivated by using standard techniques (Amann, R.F. *et al.* 1995). It has been already realized that only a minor fraction of the microorganisms (1-5%) is amenable to standard

culturing techniques (Fuhrman *et al.*, 1993; Liesack, 1992; Schmidt, 1991). Due to this difference between cultivable and in situ diversity, it is often difficult to assess the significance of cultured members in resident microbial communities. In order to overcome the limitations associated with cultural approaches a molecular alternative has been developed. The development of techniques for the analysis of 16S rRNA sequences in natural samples has greatly enhanced our ability to detect and identify bacteria in nature (Pace *et al.*, 1986). This involves DNA extraction of community DNA directly from water, soil or sediments followed by PCR amplification and then sequencing of 16S rRNA genes, which are known to be one of the established phylogenetic markers (Woese, C.R. 1987). Such approach has been successfully applied for hot spring (Ferris, M.J. *et al.*, 2003), compost (Ueda, K. *et al.*, 2001), marine

bacterioplankton (Fuhrman, J.A., et al. 1993), soil (Nakatsu, C. et al. 2000) as well as hydrothermal environment (Moyer, C.L., et al. 1994).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique is now routinely used in many microbiological laboratories worldwide as molecular tool to compare the diversity of microbial communities and to monitor population dynamics. Separation fragments in DGGE is based on the decreased electrophoretic mobility of partially melted double-stranded DNA molecules in polyacrylamide gels containing a linear gradient of DNA denaturants (a mixture of urea and formamide). Molecules with different sequences may have a different melting behavior, will stop migrating at different positions in gel. More information about the identity of community members can be obtained by hybridization analysis of DGGE patterns with polynucleotide probes or direct sequencing of reamplified DGGE bands (Muyzer, G., 1999).

Our objective in this study was to describe the diversity and constructing the phylogeny tree of bacterial community inhabiting one of hot spring at Gedongsongo field of Ungaran volcano, central Java. The extensive study has been done to this field according their geophysical and geochemistry study (Widarto et al, 2003). The hydrothermal system of Gedongsongo field consists of some hot-springs, hot-pools, and steaming ground. However, there has no report according their microbial diversity. Aminin et al (2003) has been isolate and characterize the extracellular proteolytic enzyme from thermophilic bacteria of Gedongsongo hot spring, but has not been characterize the species of this thermophile.

2. Experimental

Description of the WGS2 hot spring and sampling procedure. WGS2 hot spring belong to Gedongsongo field that located in the southern flank of Ungaran volcano, central Java (110°20'23,4"E; 07°12'08,5"S; and the altitude 1400m). This hot spring has temperature 70,2°C and pH 5,85. The microbial sample was collected on 11 June 2004 from one point (the center) of WGS2 hot spring. The microbial diversity studies were approached using two methods: cultivation and filtration. The cultivation procedure was carried out using two

kinds of minimal mediums which are MM₁ and MM₂. The formula of MM₁ medium is like ½ LB and MM₂ like NB medium, except the water which were used is the spring water. These medium were cultured at 60°C without shaking for 24 hours. For the filtration procedure, the water sample was kept in a sterile plastic container (2L) and brought to the laboratory immediately within 2 hours. Afterwards, cells were harvested by filtration of 1 L volumes of spring water gently through 0,2 µm (nominal pore size) Millipore filters. Resulting filtrates containing bacterial communities were stored at -20°C until DNA was extracted.

Nucleic acid extraction. Each microbial sample which is from cultivation or filtration was pellet by centrifugation. DNA was extracted using slight modifications of a method described by Klijn et al. (1991). The pellet was suspended in 200 µl of 10 mM Tris HCl buffer (pH 8.0) containing 8mg/ml of lysozyme and incubation at 37°C for 1 h, the cells were lysed by adding 200 µl lysis buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate, 0,8 mg/ml proteinase K and 200 mM EDTA pH 8,0. The lysis process was done by incubation at 50°C for 30 min. The purification step was carried out by adding 200 µl of chloroform:isoamil-alcohol (24:1), vortex and centrifugation at 1300 g, 30 second. The upper solution was moved to clean tube. This step was done 3 times. Subsequently, the DNA was precipitated by adding 60 µl of 3 M sodium acetate and 1 ml of 96% ethanol (stored at -20°C). After centrifugation, the DNA pellet was dissolved in 10 mM Tris HCl buffer (pH 8.0). The DNA pellet was washed with 70% ethanol and finally dissolved in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA).

PCR. The amplification of partial 16S rRNA genes of the domain *Bacteria* were as previously described (Ferris, et al, 1996). One primer (P1) complements a region conserved among members of the domain *Bacteria* (*Escherichia coli* positions 1055 to 1070). The other primer (P2) is based on a universally conserved region (*E. coli* positions 1392 to 1406; and incorporates a 40-base GC clamp). The primer sequence:

P1: 5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'

P2:5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCG
GCCCGCCGCCCCGCCCCACGGGCGGT
GTGTAC-3'.

The specificity of this primer is imparted by the underlined region. Theoretically, these primers should amplify a 323-bp section of the 16S rRNA genes of members of the domain *Bacteria*, including the highly variable V9 region. PCRs were performed by using cloned *Pfu* DNA polymerase according to the instructions provided by the manufacturer (Promega). PCR products were examined on ethidium bromide-stained agarose gels, and the reaction mixtures yielding products of the expected size were used for DGGE analysis. The temperature cycle for the PCR was 1 min of denaturation at 94°C, 1 min of annealing (see below), and 3 min of primer extension at 72°C. An initial denaturation step in which the temperature of the PCR mixture (without the polymerase) was raised to 94°C for 5 min and then lowered to 80°C for 1 min, at which time the polymerase was added, was used. During an initial touchdown cycle, the annealing temperature was lowered from 53 to 43°C in intervals of 18°C per cycle; 20 additional annealing cycles were done at 43°C. The final primer extension was for 10 min.

DGGE. All reagents and techniques were as previously described, except as noted (Ferris, et al, 1996). Acrylamide gels (8%) were prepared

and run with 0.5x TAE buffer (13 TAE is 0.04 M Tris base, 0.02 M sodium acetate, and 1.0 mM EDTA; pH adjusted to 7.4). An Ingeny Phor U gel electrophoresis unit was used with glass plates (16 by 18 cm), 1.0-mm spacers, and 1-cm-wide loading wells. A 15 liter aquarium served as the lower buffer chamber. DGGE gels contained a 20 to 60% gradient of urea and formamide (UF) solution increasing in the direction of electrophoresis. A 100% UF solution is defined as 40% (vol/vol) formamide plus 7.0 M urea (1, 20). DGGE was conducted at 60°C, firstly at 20V for 10 min and then at a constant voltage of 200 V for 5 h.

Silver Staining. Gel was stained with silver staining method (Bassam, B.J. et al., 1991). Firstly, gel was fixed using 10% acetic acid for 2x10 minutes and then rinsed with distilled water for 6 minutes. Subsequently gel was stained for 30 min in 100 ml silver nitrate solution containing 0,1 % AgNO₃ and 150 µl formaldehyde/HCHO 37%. After that, gel was rinsed for about 10 seconds in distilled water and immediately soaks with the cold (4-10°C) developing solution (100 ml solution containing 3 % sodium carbonate, 150 µl formaldehyde and 20 µl sodium thiosulfate stock solution (10 mg/ml)) for 2 to 5 minutes. Therefore, the solution is typically replaced every few minutes until the desired staining intensity is reached. Terminate staining by

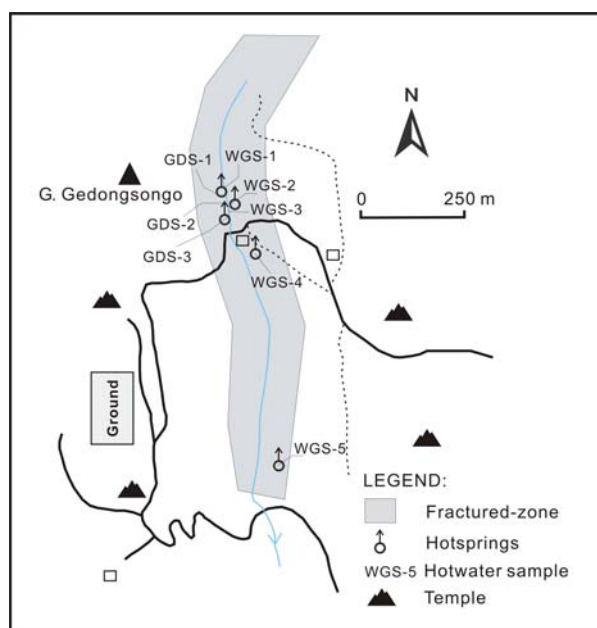


Fig 1. The location of Gedongsongo field. The hot springs are WGS-1, WGS-2, WGS-3, WGS-4, and WGS-5 (Widarto, D.S. et al., 2003).

discarding the developing solution and replacing it with 10% acetic acid.

3. Result and Discussion

This study focused on the bacterial community in a 70,2°C hot spring that named it WGS-2. Actually, beside this hot spring, there are several hot springs that closed to this spring. Figure 1 can represent the location of five hot springs in Gedongsongo field.

The community study of bacteria in this hot spring was carried out using cultivation method and direct analysis through filtration of spring water. According our knowledge, microorganisms from the extreme environment are tending to growth well in a minimal medium and they need the trace element to support their metabolism. In this study, we used

MM₁ and MM₂ medium, that contain a half recipe of LB medium and NB medium respectively, and the need of trace element will be fulfilled by using the spring water in this medium. The using of these medium assumed that there will a lot enough kinds of microorganism that growth in.

The cells both from cultivation and filtration are lysed to extracted their chromosomal DNA for used as a template in amplification of 16S rRNA gene. The result is shown in figure 2; all of the DNA bands appear in the same size, about 23 kb which prove that these bands represent the chromosomal DNA of microorganism.

Theoretically, the primer pair of P1 and P2 should amplify a 323-bp section of the 16S

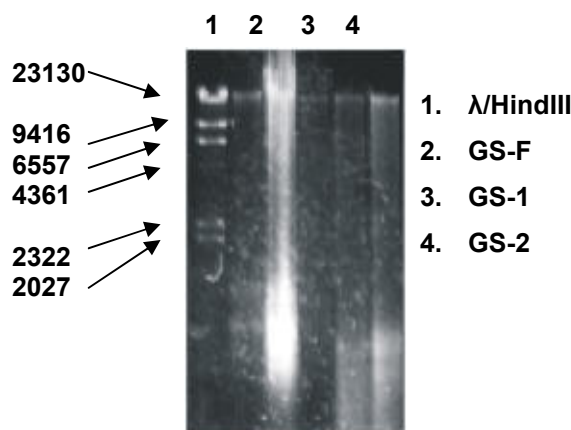


Fig 2. The electrophoresis profiles of chromosomal DNA that were extracted from the cells of filtration (GS-F); culture MM₁ (GS-1), and culture MM₂ (GS-2) respectively.

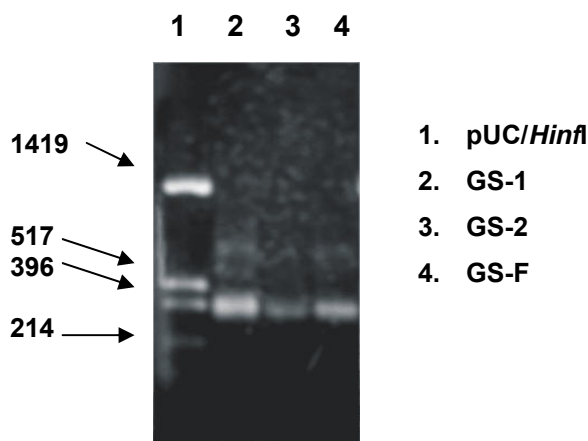


Fig 3. Amplicon profiles of PCR-amplified 16S rDNA segments. GS-1, GS-2, and GS-F, the amplicon of PCR product used DNA template from culture of MM₁, culture MM₂ and filtration respectively.

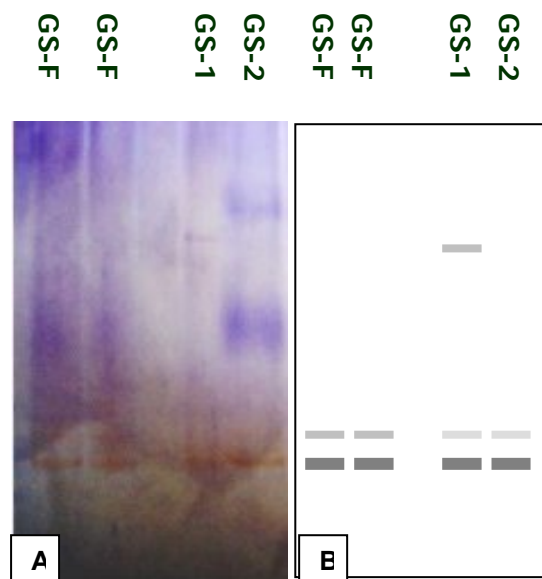


Fig 4. DGGE patterns of PCR-amplified 16S rDNA fragments. A. the real DGGE pattern, B. the illustration bands of DGGE patterns.

rRNA genes of members of the domain Bacteria. The PCR product as shown in figure 3 showed that the bands from GS-1, GS-2, and GS-F appear align with the third band of marker pUC/*Hinfl*. The sizes of these bands are about 300 bp.

DGGE profiles of the bacteria community of WGS-2 hot spring from filtration and cultivation were obtained (Fig.4). The illustration of DGGE patterns show that there are distinct two bands that appear in GS-F, GS-1, and GS-2. It means that these bands represent the predominant bacteria that live in this spring. However, there is one band in the lane of GS-1. This band doesn't appear in GS-F, perhaps because this organism is not dominant in the spring but can growth well in medium $\frac{1}{2}$ LB.

5. Acknowledgement

This study was funded by Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi (P4T), Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi. (Contract no. 321/P4T/DPPM/HPTP/IV/2004)

We thank to Djedi S. Widarto from Geologi Department LIPI Bandung for providing access to the geological data of Gedongsongo field.

6. References

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Aminin, A.L.N., Mulyani, N.S., dan Susilawati, T. 2003, Isolasi dan Karakterisasi Enzim Proteolitik dari Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gedong Songo-Ungaran, Semarang, *Laporan Penelitian DIKS MIPA UNDIP*, 2002-2003.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles, and P. M. Greshoff. 1991. Fast and sensitive staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **196**:80–83.
- Nakatsu, C.H., Vigdis Torsvik, and Lise Øvrea's, 2000, Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**:1382–1388.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A, and Munch, J.C., 2004, Bacterial Diversity in Agricultural Soils during Litter Decomposition, *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **70**, No. 1, p. 468–474
- Ferris, M.J., Muyzer, G. and Ward, D.M., 1996, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community, *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **62**, No-2, p. 340-346
- Ferris, M.J., Kuhl, M., Wieland, A., and Ward, D.M., 2003, Cyanobacterial Ecotypes in Different Optical Microenvironments of a 68°C Hot Spring Mat Community Revealed by 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region Variation,

- Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **69**, No. 5, p. 2893–2898
- Fuhrman, J. A., McCallum, K., and Davis, A.A., 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Applied & Environmental Microbiology*, **59**:1294–1302.
- Klijn, N., Weerkamp, A. H., and de Vos, W. M., 1991, Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction-Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes, *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **57**, No. 11, p. 3390-3393
- Liesack, W., and E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**:5072–5078.
- Martin, A.P, 2002, Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities, *Applied & Environmental Microbiology* , Vol. **68**, No. 8, p. 3673–3682
- Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M., 1995, Phylogenetic Diversity of the Bacterial Community from a Microbial Mat at an Active, Hydrothermal Vent System, Loihi Seamount, Hawaii, *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **61**, No. 4, p. 1555–1562.
- Muyzer, G., 1999, DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes from Natural Ecosystems, *Current Opinion in Microbiology* **2**: 317-322
- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:1–55.
- Schmidt, T. M., E. F. DeLong, and N. R. Pace. 1991. Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**:4371–4378.
- Ueda, K., Ohno, M., Yamamoto, K., Nara, H., Mori, Y., Shimada, M., hayashi, M., Oida, H., Terashima, Y., Nagata, M., and Beppu, T., 2001, Distribution and Diversity of Symbiotic Thermophiles, *Symbiobacterium thermophilum* and Related Bacteria, in Natural Environments, *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. **67**, No. 9, p. 3779–3784
- Widarto, D.S., Indarto, S., dan Gaffar, E.Z., 2003, Hasil Awal Geotermometri Kimia Airpanas Lapangan Panasbumi Gedongsongo di Lereng Gunung Ungaran, Jawa Tengah, *Buletin Geologi*, Vol. **35**, No.2, h.55-73
- Woese, C.R., 1987, The Universal Ancestor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. **95**, pp. 6854–6859.

Kesan Suhu Dan Tekanan Semasa Penggorengan Terhadap Ciri-ciri Pengelatinan Tepung Beras

Salma, M.Y, Maskat, M.Y, Wan Aida, W.M. & Aminah, A.

Program Sains Makanan
Fakulti Sains & Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600, Bangi, Selangor
email: yusofm@ukm.my

Abstrak

Kajian ini dijalankan untuk menilai kesan suhu dan tekanan terhadap ciri-ciri pengelatinan tepung beras semasa penggorengan. Cecair penyalut dihasilkan melalui percampuran tepung beras kepada air dalam nisbah 1:1.2 (tepung:air). Nugget ayam dicelup ke dalam cecair penyalut dan digoreng pada suhu 150, 165 dan 180°C pada 102 kPa (tekanan atmosfera) dan 156 kPa selama 0, 6, 18 dan 30 saat. Salutan sampel gorengan ini seterusnya dianalisis menggunakan Kalorimeter Pembias Kebezaan (DSC). Parameter yang direkodkan adalah suhu awal (T_o), suhu puncak (T_p) dan suhu akhir (T_f). Darjah pengelatinan sampel turut dianalisis. Hasil menunjukkan suhu dan tekanan semasa penggorengan tidak memberi kesan yang signifikan terhadap parameter pengelatinan iaitu suhu awal (T_o), suhu puncak (T_p) dan suhu akhir (T_f). Walaubagaimanapun, menggunakan suhu yang lebih tinggi semasa penggorengan (180°C) pada kedua-dua tekanan memberi kesan peningkatan kadar pengelatinan semasa penggorengan. Oleh kerana tiada perubahan yang signifikan diperolehi pada semua perlakuan terhadap suhu awal (T_o), suhu puncak (T_p) dan suhu akhir (T_f), kesan suhu penggorengan yang lebih tinggi dalam peningkatan kadar pengelatinan kemungkinan besar disebabkan oleh peningkatan kadar pemindahan haba terhadap salutan semasa penggorengan.

Kata kunci : Pengelatinan, DSC, tepung beras, suhu, tekanan penggorengan.

1. Pendahuluan

Penggorengan minyak banyak yang dijalankan terhadap pelbagai jenis makanan bersalut adalah merupakan kaedah memasak yang popular di seluruh dunia (Kimber 1987). Salutan yang digunakan dalam makanan bergoreng, lazimnya mengandungi tepung beras sebagai komponen utama. Pelbagai aspek tentang pengelatinan tepung telah dikaji sejak beberapa tahun yang lepas, selaras dengan peranannya dalam berjenis-jenis amalan pemprosesan makanan seperti pembuatan kek dan roti serta pengeluaran bijirin. Walaubagaimanapun, maklumat tentang pengelatinan yang berlaku dalam sistem salutan produk gorengan adalah amat terhad pada masa sekarang.

Pengelatinan bukan sahaja bergantung kepada nisbah tepung/air tetapi turut dipengaruhi oleh pelbagai parameter pemprosesan seperti suhu, kadar pemanasan dan saiz granula (Sakonidou et al. 2003). Jelasnya, terdapat banyak faktor yang dapat mempengaruhi pengelatinan dalam satu-satu masa, maka kajian yang lebih mudah dan ringkas adalah lebih bermakna. Kajian perbandingan terhadap kesan suhu dan tekanan semasa penggorengan terhadap ciri-ciri pengelatinan tepung beras turut terhad sehingga sekarang.

Penggorengan adalah proses memasak dan mengeringkan makanan menerusi sentuhan oleh minyak panas dengan melibatkan perpindahan haba dan jisim. Ia melibatkan suatu proses dinamik di mana air terwap keluar

dalam bentuk buih-buih dan bermigrasi daripada bahagian dalam makanan ke bahagian permukaan. Keras yang terbentuk di permukaan luar makanan adalah hasil daripada dehidrasi oleh minyak panas (Aguilera 2001). Proses inilah yang mungkin dipengaruhi oleh suhu dan tekanan semasa penggorengan yang mungkin memberi kesan terhadap proses pengelatinan.

Maka, objektif kajian ini dilakukan adalah untuk menentukan kesan suhu dan tekanan terhadap ciri-ciri pengelatinan tepung beras semasa penggorengan.

2. Percobaan

Penyediaan sampel

Tepung beras (Jenama Erawand, Tiga Gajah Cho Heng Sdn. Bhd., Pulau Pinang) diperolehi daripada Pasaraya Desanika, Bandar Baru Bangi. Tepung tersebut dicampurkan dengan air pada nisbah 1:1.2 (tepung:air). Nugget ayam dicelup kepada cecair penyalut dan digoreng pada suhu 150, 165 dan 180°C, di bawah tekanan atmosfera (102 kPa) dan 156 kPa selama 0, 6, 18 dan 30 saat. Salutan sampel gorengan itu kemudiannya dipisahkan dan dikeringkan menggunakan pengering sejuk-beku selama 15 jam. Sampel itu dinyahlemak menggunakan Kaedah Ekstraksi Soxhlet (AOAC 1990) selama 2 jam dengan menggunakan heksana sebagai pelarut.

Kalorimeter Pembias Kebeza (DSC)

Suhu pengelatinan dan perubahan entalpi diukur menggunakan alat Mettler-Toledo DSC 822°. Perisian STAR^c digunakan untuk menilai termogram DSC yang diperolehi. Sebanyak 5 mg sampel digunakan untuk setiap ujikaji dan diletakkan dalam pan aluminium. Pan tersebut dipaterikan secara hermetik dengan menggunakan aksesori bagi sampel mudah

meruap dan dibiarkan mencapai keseimbangan dalam baling pengering selama 2 jam pada suhu ambien. Sampel kemudian dipanaskan dari suhu 25°C – 120°C pada kadar 10°C/min. Satu pan kosong digunakan sebagai kawalan. Suhu awal (T_o), suhu puncak (T_p) dan suhu akhir (T_p) dan tenaga endotermik (ΔH) dicatat.

Analisis Statistik

Data yang diperolehi dianalisis menggunakan perisian *Statistical Analysis System* versi 6.12 (SAS 1998) menggunakan kaedah analisis ujian-t. Dalam semua analisis yang dilakukan, aras keyakinan adalah 95% ($p=0.05$). Kesemua perlakuan dianalisis secara 3 replikasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Jadual 1 menunjukkan suhu pengelatinan tepung beras. Didapati suhu awal pengelatinan tepung beras bagi setiap suhu dan tekanan semasa penggorengan adalah 78 - 79°C.

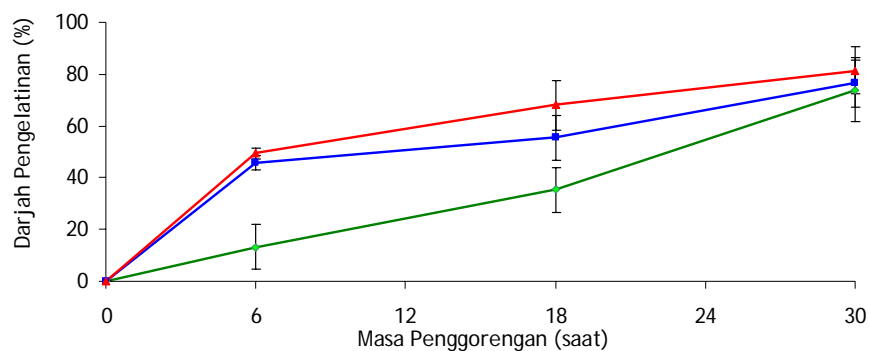
Suhu puncak pengelatinan turut mencatatkan bacaan yang hampir sama iaitu dalam julat 81 - 82°C bagi setiap perlakuan penggorengan, manakala suhu akhir pengelatinan adalah 85 - 86°C. Suhu puncak pengelatinan salutan beras didapati berada dalam julat yang sama seperti yang dilaporkan oleh St-Pierre et al. (1997) iaitu sekitar 60 - 100°C. Ini menunjukkan bahawa, walaupun dikenakan suhu dan tekanan berbeza, tepung beras tetap mengelatin pada julat suhu yang sama mengikut sumber dan ciri-cirinya. Hasil turut menunjukkan suhu dan tekanan semasa penggorengan tidak memberi kesan signifikan terhadap suhu awal, suhu puncak dan suhu akhir pengelatinan (Jadual 1).

Berdasarkan Rajah 1, diperhatikan dengan jelas bahawa dengan menggunakan suhu penggorengan yang lebih tinggi (180°C),

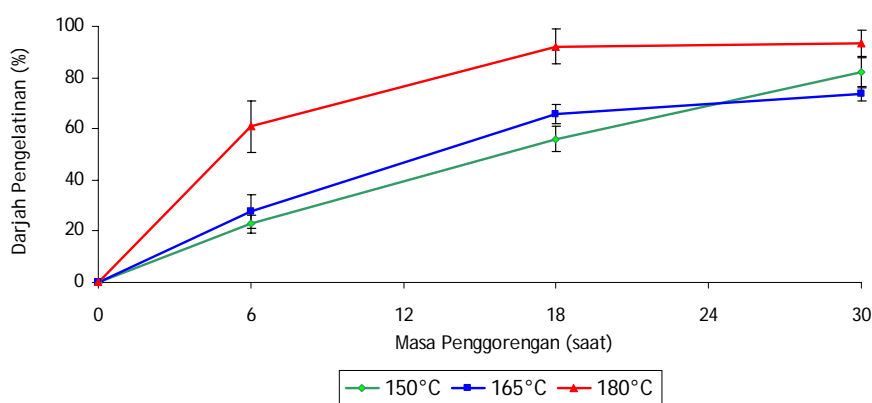
JADUAL 1. Suhu Pengelatinan Bagi Salutan Tepung Beras Yang Digoreng Pada Suhu dan Tekanan Yang Berbeza Pada Saat ke-30 Penggorengan.

Kesan	6 saat			18 saat			30 saat		
	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)
Tekanan (kPa)	102	82.00 ^a	85.67 ^a	79.15 ^a	83.12 ^a	86.31 ^a	78.99 ^a	82.55 ^a	86.41 ^a
	156	78.20 ^a	82.00 ^a	85.82 ^a	78.79 ^a	82.44 ^a	86.19 ^a	79.32 ^a	82.91 ^a
Suhu (°C)	150	78.42 ^a	81.87 ^a	85.44 ^a	78.65 ^a	82.93 ^a	85.86 ^a	79.04 ^a	82.60 ^a
	165	78.49 ^a	82.30 ^a	86.15 ^a	79.21 ^a	82.69 ^a	86.63 ^a	79.29 ^a	82.98 ^a
	180	78.15 ^a	81.84 ^a	85.65 ^a	79.11 ^a	82.78 ^a	86.28 ^a	79.14 ^a	82.61 ^a

* T_o (suhu awal), T_p (suhu puncak), T_c (suhu akhir) pengelatinan.



(a)



(b)

RAJAH 1. Darjah Pengelatinan Salutan Beras Semasa Penggorengan Pada Suhu Berbeza Dengan Tekanan Penggorengan a) 102 kPa dan b) 156 kPa

samada dengan tekanan 102 atau 156 kPa, kedua-duanya menyebabkan peningkatan yang konsisten terhadap darjah pengelatinan salutan beras. Tren ini dapat dilihat seawal saat ke-6 penggorengan dan berterusan hingga saat ke-30 penggorengan. Hasil yang sama dapat diperhatikan oleh Lin 1997 yang mengkaji tentang kesan suhu, di mana penurunan suhu doh menghasilkan darjah pengelatinan yang lebih rendah semasa proses mengeringkan makanan haiwan. Walaubagaimanapun, kesan tekanan didapati kurang signifikan terhadap darjah pengelatinan. Kajian ini turut menunjukkan bahawa, walaupun selepas 30 saat penggorengan, salutan beras masih belum tergelatin 100%.

4. Kesimpulan

Oleh kerana tiada perubahan signifikan berlaku terhadap suhu awal, puncak dan akhir pengelatinan pada semua perlakuan, kesan suhu penggorengan yang lebih tinggi dalam meningkatkan kadar pengelatinan kemungkinan

besar bergantung kepada kenaikan kadar aliran haba yang berlaku kepada salutan tepung beras semasa penggorengan.

5. Ucapan Terimakasih

Pengarang ingin merakamkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi di atas bantuan kewangan untuk kajilidikan ini di bawah peruntukan IRPA 03-02-02-0059-EA119.

6. Daftar Pustaka

- A.O.A.C. 1990. *Official Method of analysis*. 15th edition. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. USA.
- Aguilera, J. M., Cadoche, L., Lopez, C., Gutierrez, G. 2001. Microstructural changes of potato cells and starch granules heated in oil. *Food Research International*. **34**: 939-947.
- Hoseney R. C. 1984. Differential Scanning Calorimetry of Starch. *Journal of Food Quality*. **6**: 169-182.

- Kimber, M. P., Holding, S. 1987. Some technological aspects of batter. *1st European Symposium on Savoury Coatings*. 85-89.
- Kotaro, M., Sadamichi K., Yasuhito, T. 2003. Influence of Physicochemical Properties of Starch on Crispness of Tempura Fried Batter. *Cereal Chemistry*. 80(3): 339-345
- Lin, S., Hsieh, F., Huff, H. E. 1997. Effects of Lipids and Processing Conditions on Degree of Starch Gelatinization of Extruded Dry Pet Food. *Lebensm-Wiss. U.Tecnol.* **30**:754-761.
- SAS. 1989-1996. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. SAS Software Release 6.12 TS020 Louisiana State University.
- Sakonidou, E. P., Karapantsios, T. D., Raphaelides, S. N. 2003. Mass Transfer Limitations During Starch Gelatinization. *Carbohydrate Polymers*. 1-9.
- St-Pierre, N., Favis, B.D., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. & Verhoogt, H. 1997. Processing and Characterization of Thermoplastic Starch / Polyethylene Blends. *Polymers*. **38** (3) : 647 – 655.
- Vasanthan, T. , Hoover, R. 1992. Effect of defatting on starch structure and physicochemical properties. *Food Chemistry*. **45**:337-347.

Pemisahan Cerium dari Mineral Monasit dengan Teknik SLM Bertingkat

Aminudin Sulaeman¹⁾, Buchari²⁾ dan Ummy Mardiana³⁾

1) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia
e-mail: amin@chem.itb.ac.id

2) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia
e-mail: buchari@chem.itb.ac.id

3) AAK BTH Tasikmalaya, Jawa Barat.

Abstrak

Cerium (IV) berhasil dipisahkan dari mineral monasit dalam dua tahap proses membran cair berpendukung (supported liquid membrane, SLM). Pada SLM tahap pertama logam-logam tanah jarang (LTJ) dipisahkan secara simultan dari larutan hasil leaching mineral monasit. Pada SLM tahap kedua cerium dipisahkan dari fasa penerima SLM pertama dengan terlebih dahulu dioksidasi menjadi Ce(IV). Larutan carrier yang digunakan pada penelitian ini merupakan campuran TBP dan D2EHPA dengan perbandingan (0,25:0,75) M dalam kerosen. Selanjutnya larutan carrier tersebut diamobilkan pada membran PTFE dengan ukuran pori 0,5 μm , dan sebagai fasa penerima digunakan larutan HCl. Pada penelitian ini oksidasi Ce(III) menjadi Ce(IV) dilakukan dengan menggunakan campuran HClO_4 dalam suasana HCl. Pada kondisi tersebut jumlah Ce(IV) yang ditranspor ke fasa penerima sangat sedikit dibandingkan dengan ion LTJ (III) lainnya, ion Ce(IV) tetap tinggal pada fasa penerima sehingga dengan mudah dapat dipisahkan dari LTJ lainnya. Faktor-faktor yang dipelajari untuk mengoptimalkan pemisahan Ce(IV) dari ion LTJ(III) adalah : dengan variasi : pH fasa umpan, konsentrasi total LTJ pada fasa umpan dan konsentrasi HCl pada fasa penerima. Nilai masing-masing parameter tersebut yang memberikan hasil pemisahan cerium (IV) terbaik diperoleh pada : pH fasa umpan 3,0, konsentrasi total LTJ dalam fasa umpan 2000 ppm. Pada kondisi ini kemurnian garam cerium berhasil ditingkatkan dari 54,8 % menjadi 91,8 %. Selain itu dengan meningkatnya konsentrasi asam pada fasa penerima laju transpor pemisahan cerium (IV) dari ion LTJ(III) lainnya juga semakin meningkat.

Kata kunci: cerium, SLM bertingkat, monasit.

1. Pendahuluan

Cerium merupakan salah satu logam tanah jarang (LTJ) yang memainkan peranan penting dalam aplikasi komersial. Cerium banyak digunakan sebagai bahan oksidator, katalis, batu pematik api, *polishing* presisi tinggi, pewarna gelas, keramik dan cat. Salah satu mineral utama cerium adalah monasit ($\text{Ln,Th}(\text{PO}_4)_3$) yang banyak terdapat di sekitar kepulauan Bangka, Belitung dan Singkep. Monasit saat ini diperoleh sebagai hasil samping pada pengolahan timah. Agar monasit menjadi bahan yang bernilai ekonomis tinggi maka perlu diolah lebih lanjut agar menjadi bahan yang bernilai ekonomis

tinggi.

Pemisahan dan pemurnian cerium dari monasit masih sulit dilakukan. Hal ini disebabkan karena kelompok LTJ mempunyai sifat-sifat kimia dan fisika yang mirip. Penelitian dan pengembangan teknik ekstraksi dan pemisahan LTJ masih perlu dilakukan mengingat sampai saat ini belum ada metode pemisahan yang benar-benar handal untuk unsur-unsur tersebut. Masalah ini memerlukan perhatian yang serius karena kebutuhan terhadap LTJ antara lain cerium terus meningkat baik dalam jumlah maupun kualitasnya. Salah satu teknik pemisahan yang berkembang saat ini adalah

pemisahan dengan teknik membran cair berpendukung (*supported liquid membrane*, SLM). Teknik ini dikembangkan dari teknik ekstraksi pelarut, yaitu dengan mengamobilkan zat pengestraksi (*carrier*) pada suatu membran polimer berpori, dengan cara ini selain selektifitas transpor menjadi meningkat, juga jumlah pengestraksi yang diperlukan menjadi sangat sedikit (kurang dari 1 % dari yang diperlukan pada ekstraksi pelarut biasa).

Dalam penelitian ini, pemisahan cerium dengan teknik SLM, menggunakan *carrier* campuran *Tributthyl phosphate* (TBP) dan asam *di(2-ethylhexyl)phosphate* (D2EHPA). Sebagai membran pendukung digunakan membran *polytetrafluoroethylene* (PTFE) berpori. Pada SLM tahap pertama LTJ dipisahkan dari unsur-unsur non LTJ, kemudian larutan LTJ yang diperoleh dari fasa penerima SLM-1 tersebut dioksidasi dengan asam perklorat. Pada SLM tahap kedua, Ce(IV) dipisahkan dari LTJ lainnya. Cerium dengan bilangan oksidasi +4 mempunyai sifat yang berbeda dengan ion lantanida (III) yang lainnya, antara lain dalam hal kemampuannya pada pembentukan senyawa kompleks dengan suatu ligan. Hal ini membuka peluang untuk dapat memisahkan Ce(IV) dari Ln(III) lainnya. Dalam penelitian ini akan diteliti pengaruh dari variasi pH fasa umpan, konsentrasi total LTJ pada fasa umpan dan konsentrasi HCl pada fasa penerima, terhadap pemisahan dan kemurnian produk Ce(IV) yang dihasilkan.

2. Percobaan

Bahan dan peralatan

Larutan *carrier* menggunakan campuran D2EHPA (*di(2-ethylhexyl) phosphoric acid*) dan TBP (*tri-butyl phosphate*) dari Aldrich Chemicals Co, USA, dalam pelarut kerosen. Larutan *carrier* dengan komposisi tertentu diamobilkan pada membran pendukung PTFE berpori. Membran pendukung tersebut selanjutnya digunakan untuk memisahkan antara fasa umpan dan fasa penerima. Perbandingan komposisi D2EHPA dan TBP yang digunakan adalah (0,25 : 0,75) M. Larutan logam disiapkan dengan melarutkan sejumlah lantanida oksida dalam asam klorida, kelebihan asam dihilangkan dengan cara diuapkan, kemudian dilarutkan dalam labu takar 250 mL dan ditepatkan dengan air destilasi. Kandungan ion logam dalam larutan ditentukan secara spektrometri setelah terlebih

dahulu dibuat kompleks berwarna dengan alizarin sulfonat pada pH 4,5. Bahan-bahan kimia lain yang digunakan dalam penelitian ini, semuanya berkualifikasi p.a. kecuali jika disebutkan lain. Peralatan eksperimen dalam penelitian ini terdiri dari gabungan 2 sel, diantara kedua sel ini diberi lubang dengan diameter 3,4 cm, pada bagian lubang inilah membran pendukung ditempatkan. Luas permukaan membran pendukung = 9,1 cm². Konsentrasi ion logam sebagai fungsi waktu ditentukan dengan mengukur absorbansi sampel yang diambil dari larutan fasa umpan atau fasa penerima, untuk LTJ tunggal dilakukan dengan spektrofotometer pada 535 nm setelah dibuat kompleks berwarna dengan indikator alizarin sulfonat pada pH 4.5. sedangkan untuk LTJ campuran dilakukan dengan menggunakan ICP-AES Merck Shimadzu AS-6. Reproducibilitas percobaan dicek dengan mengambil rata-rata hasil eksperimen dari dua kali pengulangan.

a. Penyiapan SLM

Larutan pengemban campuran dibuat dari campuran D2EHPA dan TBP dalam pelarut kerosen. Membran cair berpendukung disiapkan dengan cara merendam membran *plat-sheet* PTFE berpori pada *carrier* campuran, kemudian kelebihan larutan pengemban yang menempel pada membran pendukung dihilangkan dengan menggunakan kertas saring. Jumlah total larutan pengemban yang ditahan pada fasa membran sekitar 0,25 ml, dengan volume fasa umpan dan fasa penerima masing-masing 100 mL.

b. Pelindian monasit

Sejumlah g monasit yang telah dihaluskan sampai lolos ayakan 100 mesh dicampur dengan NaOH dengan perbandingan massa 1 : 1, kemudian dimasukkan ke dalam suatu bom-teflon, setelah ditutup rapat kemudian bom-teflon tersebut disimpan dalam oven dengan suhu 200°C selama 2 jam. Setelah dingin kemudian dilarutkan dalam 200 mL air kemudian disaring. Filtratnya ditampung dalam labu takar 1 L, dan diasamkan dengan HCl sampai pH=3, endapan yang terbentuk kemudian disaring dan filtratnya dijadikan sebagai larutan fasa umpan SLM-1.

c. SLM-1

Disiapkan satu set SLM (terdiri dari dua tabung yang dimampatkan dengan dibagian tertentu diberi lubang tempat pasangannya membran SLM . membran tersebut juga berfungsi sebagai pemisah antara fasa umpan dan fasa penerima. Bagian tabung fasa umpan diisi 100 mL larutan umpan, dan tabung bagian penerima diisi larutan 100 mL 3 HCl M. kemudian proses dijalankan dengan mengaduk kedua bagian secara sinkron selama 300 menit. Larutan fasa penerima SLM-1 selanjutnya dijadikan sebagai bahan larutan umpan SLM-2

d. Oksidasi Ce(III) → Ce(IV)

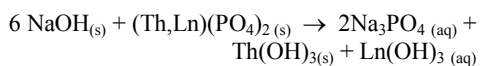
Oksidasi Ce(III) → Ce(IV) dalam larutan fasa penerima SLM-1 dilakukan dengan HClO₄ pekat dan HCl pada suhu 140 °C selama 20 menit. Selanjutnya larutan hasil oksidasi ini digunakan sebagai bahan larutan umpan SLM-2

e. SLM-2

Disiapkan satu set SLM seperti pada pengerjaan bagian c) tabung fasa umpan diisi 100 mL larutan bahan larutan umpan SLM-2, setelah terlebih dahulu diatur pH-nya dan konsentrasinya sesuai dengan yang dikehendaki. Tabung bagian fasa penerima diisi larutan 100 mL HCl dengan konsentrasi sesuai yang dikehendaki. Larutan produk diperoleh dari fasa umpan setelah proses dijalankan selama 300 menit. Penentuan konsentrasi LTJ dalam fasa umpan dan fasa penerima dilakukan dengan ICP-AES.

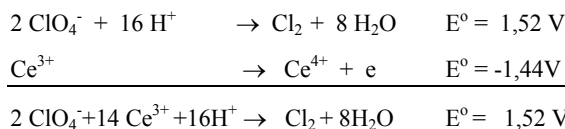
3. Hasil dan pembahasan

Metode destruksi monasit yang dipilih pada penelitian ini adalah metode destruksi basa, karena cara destruksi seperti ini thorium dapat dipisahkan dari awal melalui pengaturan pH.. Pada pH larutan =3 thorium(III) dapat dipisahkan dari lanthanid(III) . sesuai reaksi berikut ini.



Pemisahan Ce(III) dari LTJ(III) lainnya sangat sulit dilakukan karena sifat kimia dan fisika ion-ion LTJ(III) dalam larutan sangat mirip. Hal itu antara lain disebabkan oleh ukuran jari-jari ion yang kecil dan hampir sama (terletak pada orbital f), muatan besar (+3), sehingga sama-sama mudah terhidrasi. Hal yang

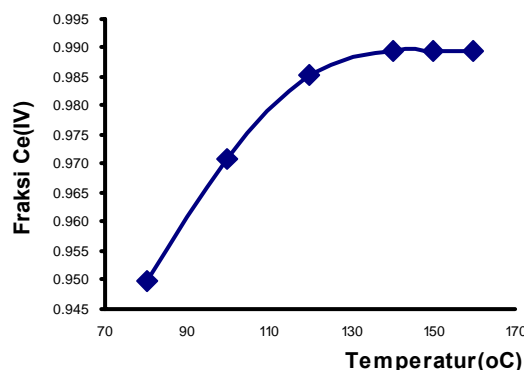
berbeda dari cerium adalah merupakan satu-satunya LTJ yang dapat dioksidasi sampai bilangan oksidasi IV. Seperti ditunjukkan pada reaksi berikut ini .



Pada tingkat oksidasi +4 cerium lebih memungkinkan untuk dipisahkan karena mempunyai sifat kimia dan fisika yang berbeda dengan LTJ(III) lainnya.

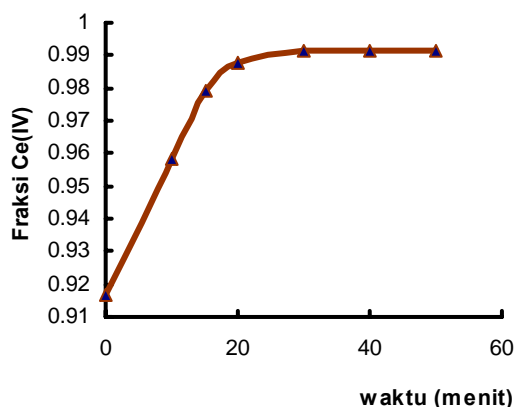
a. Optimasi oksidasi Ce(III) → Ce(IV)

Parameter yang dipelajari untuk optimasi kondisi oksidasi Ce(III) → Ce(IV) adalah temperatur dan waktu oksidasi. Pengaruh temperatur dan waktu oksidasi terhadap fraksi Ce(IV) yang terbentuk ditunjukkan pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Pengaruh temperature oksidasi terhadap jumlah fraksi Ce(IV) yang terbentuk.

Dari gambar.1 ditunjukkan bahwa pada temperatur dari temperature 80 °C - 140°C dengan semakin meningkatnya temperatur yang diberikan pada proses oksidasi jumlah Ce(IV) yang terbentuk terus meningkat, tetapi peningkatan temperatur setelah temperature 140°C, peningkatan temperatur selanjutnya tidak menambah lagi jumlah Ce(IV) yang terbentuk. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh gambar 2., setelah waktu pemanasan 20 menit tidak menunjukkan adanya jumlah Ce(IV) yang terbentuk. Dari data tersebut diperoleh



Gambar 2 Pengaruh waktu oksidasi terhadap jumlah fraksi Ce(IV) yang terbentuk

informasi kondisi oksidasi $Ce(III) \rightarrow Ce(IV)$ dicapai pada temperature proses $140^{\circ}C$ dan dalam waktu 20 menit.

b. Pengaruh pH terhadap laju transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM

Pengaruh variasi pH fasa umpan terhadap transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM dipelajari dari pH 2 - 4, pemilihan rentang pH ini didasarkan pada data-

Penelitian sebelumnya bahwa pada pH dibawah 2 dan di atas pH 4 transpor LTJ melalui SLM tidak begitu baik. Gambar 3

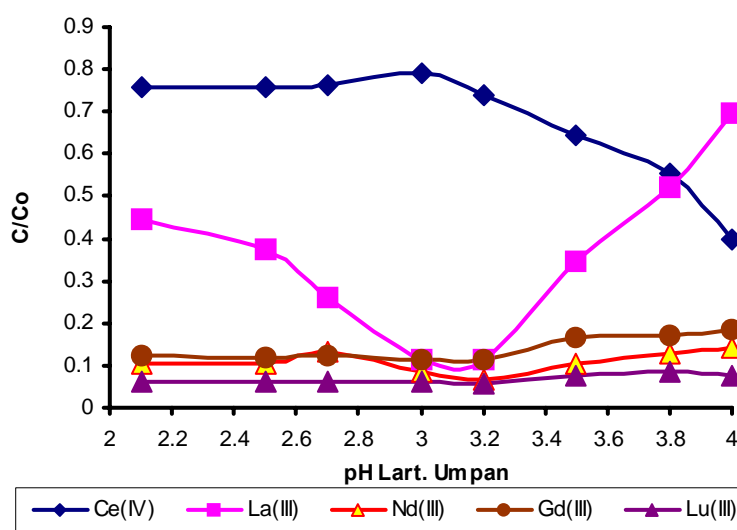
menunjukkan pengaruh pH fasa umpan terhadap fraksi konsentrasi masing-masing ion LTJ dalam fasa umpan .

Dari gambar 3 ditunjukkan bhwa dari ke lima ion LTJ yang dipelajari sifat transpornya melalui SLM, yang banyak dipengaruhi perubahan pH fasa umpan adalah La(III). Tetapi yang dicari dalam penelitian ini adalah mendapatkan pH fasa umpan yang memberikan transpor minimum untuk ion Ce(IV) dan transpor maksimum untuk ion-ion LTJ(III) lainnya. Dan gambar 3 jelas kondisi tersebut diperoleh pada pH larutan umpan =3. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4. Pada gambar 4 ditunjukkan pola transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM pada pH larutan umpan =3.

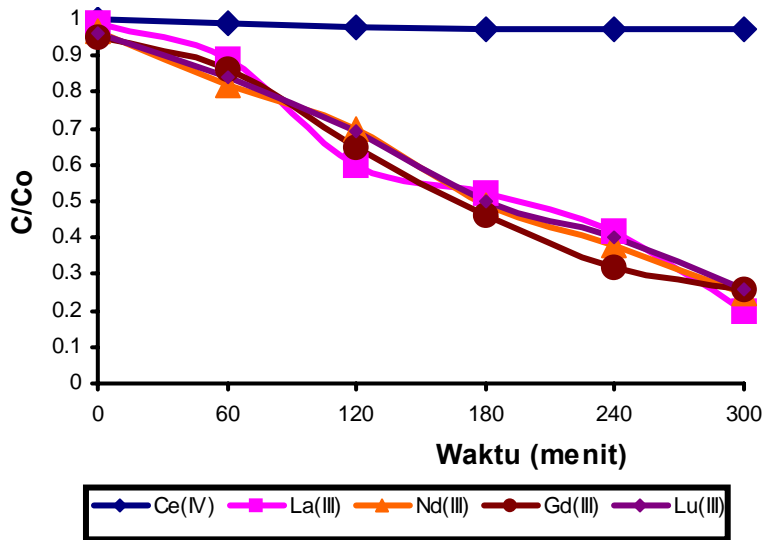
Pada gambar 4. ditunjukkan bahwa Ce(IV) tidak ditranspor. Seangkan dari gambar tampak sedikit ada yang ditraspor, hal itu disebabkan oleh adanya ion Ce(IV) yang berubah menjadi ion Ce(III), disisi lain ion LTJ(III) lainnya ditranspor ke fasa penerima dengan kecepatan transpor yang hampir sama. Berdasarkan hasil eksperimen tersebut, dibuktikan bahwa dengan teknik SLM ini, ion Ce(IV) dapat dipisahkan ion LTJ(III) lainnya.

c. Pengaruh konsentrasi HCl dalam fasa penerima terhadap transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM

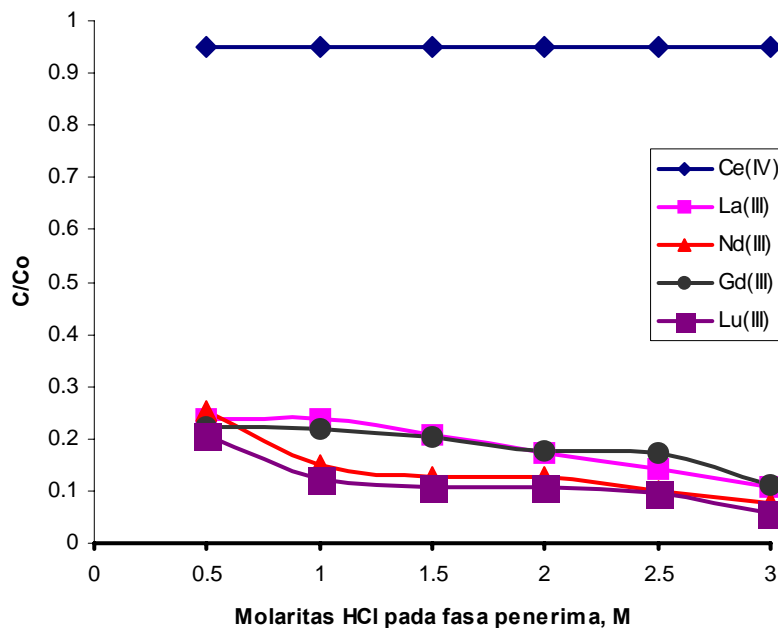
Pengaruh variasi konsentrasi HCl dalam fasa



Gambar 3. Pengaruh pH fasa umpan terhadap fraksi ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) yang tertahan pada fasa penerima setelah diproses dengan SLM selama 300 menit, dengan konsentrasi HCl pada fasa penerima 0.5 M.



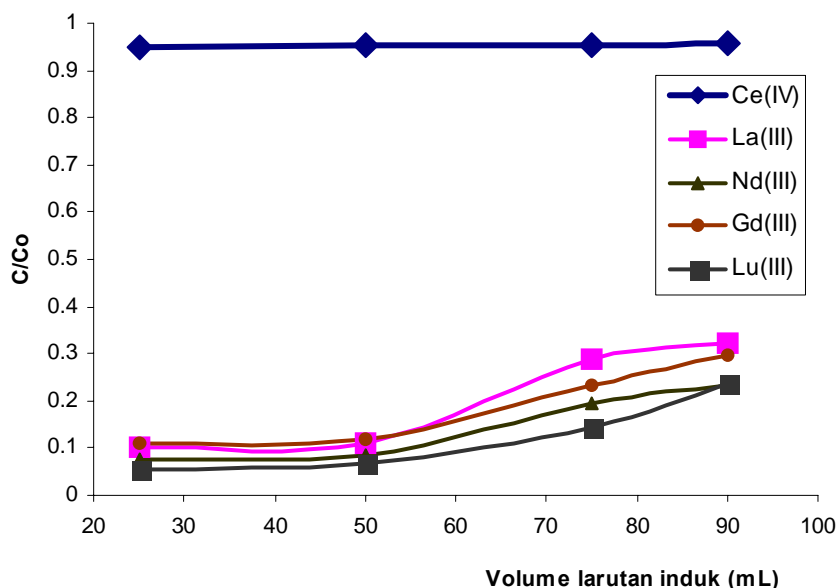
Gambar 4 Pola transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM, pada pH fasa umpan =3.



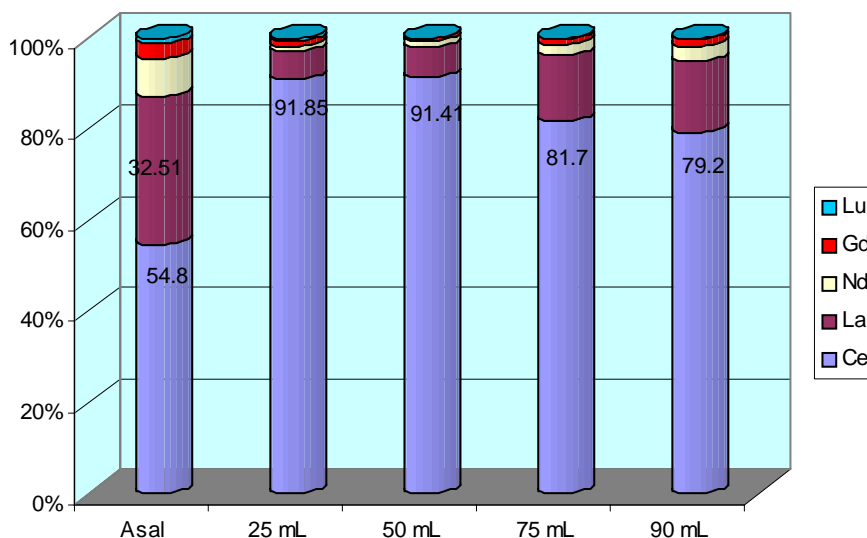
Gambar 5. Pengaruh konsentrasi HCl pada fasa penerima terhadap fraksi ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) yang tertahan pada fasa umpan setelah diproses dengan SLM selama 300 menit, dengan pH fasa umpan =3

penerima terhadap transpor ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SL. Konsentrasi HCl dalam fasa penerima divariasikan dari mulai konsentrasi 0,5 M – 3 M. Gambar 5. menunjukkan pengaruh variasi konsentrasi HCl terhadap fraksi konsentrasi masing-masing LTJ yang dipelajari dalam fasa umpan.

Pada gambar 5. ditunjukkan bahwa, dengan semakin bertambahnya konsentrasi HCl dalam fasa penerima, jumlah ion LTJ yang ditranspor juga meningkat, hal ini terutama disebabkan oleh adanya peningkatan gradient pH sebagai pendorong transpor dan bertambahnya daya terima fasa penerima terhadap ion-ion tanah jarang yang ditranspor. Hal ini sebenarnya tidak berpengaruh terhadap kecepatan transpor



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi LTJ pada fasa umpan terhadap fraksi ion Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) yang tertahan pada fasa umpan setelah diproses dengan SLM selama 300 menit, dengan pH fasa umpan =3 dan konsentrasi HCl pada fasa penerima 3 M.



Gambar 7. Pengaruh volume pipetasi (Konsentrasi LTJ) dalam fasa umpan terhadap % komposisi LTJ dalam fasa umpan (produk) setelah diproses dengan SLM selama 300 menit, dengan pH fasa umpan =3 dan konsentrasi HCl pada fasa penerima 3 M

ion Ce(IV), karena pada kondisi ini ion Ce(IV) tidak bisa membentuk kompleks dengan *carrier*, sehingga tetap tidak ditranspor. Namun demikian fenomena tersebut justru akan meningkatkan kemurnian dari Ce(IV) yang diperoleh.

d. Pengaruh konsentrasi LTJ dalam fasa umpan terhadap transpor ion Ce(IV),

La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) melalui SLM

Dari informasi tentang pengaruh variasi konsentrasi HCl dalam fasa penerima terhadap transpor ion LTJ melalui SLM. Maka untuk meningkatkan efisiensi proses, penelitian selanjutnya difokuskan pada konsentrasi LJT maksimum berapa dalam fasa umpan yang dapat memberikan kemurnian Ce(IV)

tertinggi?. Komposisi ion LTJ dalam fasa penerima SLM-1 (larutan induk fasa umpan SLM-2) adalah sebagai berikut : Ce(III) 2135 ppm; La(III) 1267 ppm; Nd(III) 330 ppm; Gd(III) 122 ppm dan Lu(III) 43 ppm dan total = 3897 ppm. Variasi konsentrasi LTJ dalam fasa umpan dilakukan dengan cara memvariasikan volume larutan induk yang dimasukkan ke fasa umpan . variasi volume pemipetan larutan induk ke fasa umpan meliputi : 25, 50, 75 dan 90 mL, setelah diatur pH-nya =3 kemudian ditanda bataskan dengan larutan pH 3 hingga 100 mL. Gambar 6. menunjukkan pengaruh variasi konsentrasi LTJ dalam fasa umpan terhadap fraksi konsentrasi Ce(IV), La(III), Nd(III), Gd(III) dan Lu(III) yang tertahan dalam fasa umpan.

Pada gambar 6. tampak bahwa pada volume pemipetan larutan induk 25 mL dan 50 mL (973 dan 1945 ppm) tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap perubahan komposisi LTJ dalam fasa umpan (larutan produk). Tetapi pada volume pemipetan larutan induk yang lebih besar (75 dan 90 mL) mulai terlihat adanya penurunan % Ce(IV) dalam larutan produk. Hal ini terjadi disebabkan oleh adanya keterbatasan daya terima dari fasa penerima. Berdasarkan data tersebut diperoleh informasi bahwa konsentrasi maksimum LTJ dalam fasa umpan untuk konsentrasi asam dalam fasa penerima 3 M adalah sekitar 2000 ppm.

Pada gambar 7. ditunjukkan bahwa, pada volume pemipetan 25 dan 50 mL larutan induk (3897 ppm) dalam satu kali proses SLM-2 konsentrasi Ce(IV) dapat ditingkatkan dari 54,8 % menjadi 91,85 dan 91,41 %.

4. Kesimpulan

Teknik SLM dapat digunakan untuk memisahkan ion LTJ dari ion non-LTJ dalam satu kali proses dengan baik. Dengan teknik ini cerium dapat dipisahkan dari ion LTJ lainnya dengan terlebih dahulu dioksidasi menjadi ion Ce(IV). Dalam satu kali tahap proses SLM kemurnian ion Ce(IV) dapat ditingkatkan dari 54,8 % menjadi 91,8 %..

5. Daftar Pustaka

1. Sulaeman, A.,(2002).Pola Transport pada Ekstraksi dan Pemisahan Unsur Tanah jarang dengan Teknik Membran Cair berpendukung Menggunakan Pengemban Campuran Asamdi(-etilheksil)fosfat (D2EHPA) dan Tributillfosfat (TBP), Desertasi Doktor, departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, 2002
2. Kopunec, R.and Benitez, JC.,(1991) Extraction of Rare Earth Elements with Organophosphorus Extractants as carrier in Supported Liquid Membranes, J of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, **150**(2), 269-280.
3. Gaiwad, A.G., (2003), Synergic Transport of Yttrium Metal Ions Through Supported Liquid Membrane, Chem. Biochem. Eng. Q., **17** (4) 327-334.

Kajian Kehadiran Platinum, Palladium dan Rhodium Dalam Sampel Debu Jalan dan Rumput Menggunakan Teknik Spektrometri Jisim Gandingan Plasma Teraruh (ICP-MS)

Amran Ab.Majid¹, Hidayah Sahar¹, Afzana Anum Ahmad Anuar¹ dan Muhamad Samudi Yasir²

¹Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan. Malaysia

email: amran@pkriscc.cc.ukm.my

² Pusat Pengajian Fizik Gunaan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan. Malaysia
email: msyasir@pkriscc.cc.ukm.my

Abstrak

Tiga unsur kumpulan logam platinum (PGE), Pt, Pd dan Rh merupakan unsur yang paling sukar ditemui dalam kerak bumi dan juga dalam sampel alam sekitar. Peningkatan penggunaan penukar bermangkin dalam kenderaan bermotor telah menyebabkan semakin bertambahnya unsur kumpulan platinum dalam alam sekitar. Kajian kehadiran unsur PGE dalam sampel debu jalan dan rumput di beberapa lokasi sekitar Lembah Kelang/ Kuala Lumpur dan UKM/ Bandar Baru Bangi telah dijalankan menggunakan teknik spektrometri jisim gandingan plasma teraruh (ICP-MS) dan spektrometri serapan optik gandingan plasma teraruh (ICP-OES). Pemilihan kawasan kajian dibuat berdasarkan perbezaan ketumpatan trafik kerana kehadiran unsur PGE dijangka berkait rapat dengan ketumpatan trafik di lokasi kajian. Keputusan kajian menunjukkan logam Pt didapati hadir pada semua lokasi persampelan bagi kedua-dua sampel debu jalan dan rumput di sekitar UKM dan Bandar Baru Bangi. Julat kepekatan logam Pt dalam sampel debu jalan di antara 1.2 hingga 116.3 ppb (ng g^{-1}), manakala bagi sampel rumput, julat kepekatan Pt adalah 2.5 hingga 102.5 ppb. Bagi Rh, kepekatan yang dapat dikesan di dalam sampel debu jalan adalah 1.8 hingga 171.4 ppb, manakala dalam sampel rumput kepekatan Rh adalah 5.0 hingga 33.8 ppb. Bagi lokasi Lembah Kelang/ Kuala Lumpur pula, Pt hanya ditemui pada tiga lokasi kajian dengan julat kepekatan 25 – 475 ppb. Manakala bagi unsur Rh semua lokasi kajian menunjukkan kehadirannya dengan julat kepekatan antara 25 – 125 ppb. Walau bagaimanapun logam Pd tidak dapat dikesan di dalam kedua-dua sampel debu jalan dan rumput. Analisis lain-lain unsur dalam sampel kajian terutama yang berkaitan dengan aktiviti automobil akan turut dibincangkan.

Kata kunci: ICP-MS, Pd, Pt, Rh.

1. Pendahuluan

Platinum (Pt), palladium (Pd) dan rhodium (Rh) adalah antara tiga unsur logam yang dikategorikan dalam unsur Kumpulan Logam Platinum (PGE) dan juga merupakan unsur yang paling sukar ditemui dalam kerak bumi. Walau bagaimanapun, penggunaan ketiga-tiga unsur ini di dalam pelbagai sektor industri kebelakangan ini, terutamanya dalam industri

automobil telah meningkatkan kehadirannya di dalam alam sekitar (Tuit et al. 2000). Penggunaannya sebagai mangkin di dalam penukar bermangkin telah mengurangkan pengeluaran bahan berbahaya seperti karbon monoksida, nitrogen oksida, dan sebatian organan meruap (VOC) yang dihasilkan daripada proses pembakaran bahan api di dalam enjin kenderaan. Pertambahan

penggunaan unsur ini boleh menyebabkan pencemaran alam sekitar akibat penyerapan unsur ini ke dalam tanaman, air serta tanah (Moldovan et al. 2001).

Keberkesanan penukar bermangkin menukarkan gas berbahaya kepada gas yang lebih mesra alam sehingga 90% telah diperakui di seluruh dunia (Barefoot 1997). Bermula pada tahun 1970-an, penggunaan penukar bermangkin telah mula diperkenalkan pada ekzos kenderaan di Amerika Syarikat (Ely et al. 2001), diikuti dengan Jerman pada pertengahan 1980-an (Schafer et al. 1999; Zereini et al. 1997). Kemudian ianya mula diperkenalkan pula di Eropah pada akhir 1980-an dan bermula pada Januari 1993, kesemua kereta keluaran terbaru di Kesatuan Eropah telah dilengkapi dengan alat ini bagi mengurangkan perlepasan gas berbahaya ke dalam udara (Jarvis et al. 2001). Namun begitu, kelengkapan ini masih mempunyai kekurangan yang tersendiri kerana kajian terdahulu telah membuktikan bahawa unsur PGE yang digunakan sebagai mangkin boleh terlepas keluar daripada pemegangnya (Jarvis et al. 2001; Tuit et al. 2000).

Penukar bermangkin merupakan suatu alat pengawal pencemaran yang diletakkan di dalam ekzos kenderaan di mana, ia mengandungi 0.10% hingga 0.15% (w/w) Pt, Pd dan Rh untuk melakukan proses penukaran bahan pencemar (Ely et al. 2001). Pt, Pd dan Rh di dalam penukar bermangkin disalutkan pada suatu struktur yang menyerupai sarang lebah atau struktur "honey comb" bagi mendapatkan luas permukaan tindak balas yang tinggi. Mangkin ini mempercepatkan tindak balas pengoksidaan dan penurunan gas yang melaluinya dan seterusnya menghasilkan gas kurang berbahaya seperti CO₂, nitrogen, oksigen dan wap air (Brains 2001).

Penukar bermangkin yang biasa digunakan merupakan penukar bermangkin tiga cara atau "Three-way Catalytic Converter" yang bermaksud tiga bahan pencemar yang menjadi sasaran penukar bermangkin iaitu molekul karbon monoksida, nitrogen oksida dan hidrokarbon tak terbakar. Penggunaan unsur Rh sebagai agen penurunan dan unsur Pt dan Pd sebagai agen pengoksidaan membolehkan penukar bermangkin menukarkan bahan berbahaya ini kepada molekul karbon dioksida, nitrogen dan wap air.

Perubahan kimia dan fizikal yang berlaku dalam sesebuah penukar bermangkin boleh menyebabkan pemegang dalam penukar bermangkin mudah haus. Dengan itu, unsur PGE yang digunakan di dalam sesebuah penukar bermangkin boleh terlepas keluar dan disebarkan ke dalam persekitaran. Unsur ini boleh tersebar jauh sehingga ke dalam sistem akuatik termasuk sedimen dan boleh memberikan kesan terhadap hidupan akuatik. Ini telah dibuktikan oleh Jarvis et al. 2001, di mana pada tahun 1997, sebanyak 64550 kg Pt digunakan untuk pengeluaran penukar bermangkin di seluruh dunia, sebanyak 16049 kg daripadanya digunakan di dalam penukar bermangkin di Eropah. Dianggarkan hanya 20 hingga 30% logam Pt yang dapat dikitar semula. Dalam masa lebih daripada 5 tahun penggunaan penukar bermangkin, kira-kira 70% logam Pt yang terdapat di dalam penukar bermangkin tersebar keluar ke persekitaran. Unsur-unsur PGE yang terbebas akan terjerap pada unsur persekitaran, seperti debu jalan, permukaan tanah, rumput dan juga air; terbebas sama ada secara terus (dari ekzos kenderaan) ataupun dengan bantuan agen sekitar seperti angin dan air hujan (Jarvis et al. 2001; Moldovan et al. 2001; Schafer et al. 1999; Barefoot 1997).

Pelbagai kesan negatif telah dikenalpasti sebagai kesan daripada pendedahan secara berlebihan terhadap unsur PGE. Antaranya adalah radang pada kulit, mata, salur pernafasan dan salur pencernaan (The National Research Council 1977). Walau bagaimanapun, kehadiran unsur PGE yang sedikit di dalam persekitaran menyebabkan kurangnya risiko terjadinya kesan negatif sama ada pada persekitaran mahupun kesihatan (Ravindra et al. 2004) Namun begitu, penggunaan unsur PGE yang semakin tinggi dalam pelbagai industri seperti barangan perhiasan, perubatan dan pergigian dan automobil mampu menambahkan kepekatan di dalam alam sekitar dan seterusnya mungkin menyebabkan pencemaran tidak mustahil untuk berlaku.

2. Percobaan

Sampel dan Lokasi kajian

Sampel debu jalan diambil dibahu jalan lokasi terpilih sekitar Lembah Kelang dan Bandar Baru Bangi menggunakan berus dan penyodok plastik. Lokasi persampelan tertumpu kepada kawasan yang mempunyai ketumpatan trafik

yang tinggi kerana kehadiran unsur PGE dijangkakan berkait rapat dengan ketumpatan trafik di sesuatu lokasi. Sampel debu jalan yang telah diambil diasingkan mengikut julat saiz dan sampel bersaiz $\leq 250 \mu\text{m}$ sahaja yang dianalisis kandungan unsur PGE. Persampelan bagi rumput juga dijalankan di lokasi yang sama dengan persampelan debu jalan. Sampel rumput dibersihkan dengan air suling yang banyak untuk membasuh bahan yang mungkin terlekat pada permukaan daun rumput. Sampel kemudiannya dikeringkan menggunakan ketuhar pada suhu 105°C selama sekurang-kurangnya 2 hari. Sampel yang telah dikeringkan dihancurkan menggunakan pengisar kering sebelum penghadaman dilakukan.

Penghadaman Sampel

Kedua-dua sampel debu jalan dan rumput dihadamkan menggunakan kaedah penghadaman basah menggunakan larutan aqua regia (HNO_3 : HCl ; 1:3). Larutan aqua regia dicampurkan dengan 2 g sampel dan dibiarkan selama sekurang-kurangnya setengah jam bagi membolehkan proses penghadaman berlaku. Campuran larutan seterusnya dipanaskan menggunakan kukus air sehingga kering. Sampel yang telah dihadamkan seterusnya dicampurkan dengan larutan asid nitrik cair dan diturunkan. Larutan hasil turasan disimpan bagi tujuan analisis unsur. Semua kerja-kerja penghadaman dilakukan di dalam kebuk wasap.

Analisis unsur kumpulan platinum (PGE)

Analisis unsur PGE dilakukan menggunakan kaedah analisis Spektrometri Pancaran Optik Gandingan Plasma Teraruh (ICP-OES – Optima 4300 DV) dan Spektrometri Jisim Gandingan Plasma Teraruh (ICP-MS- ELAN 6000). Selain daripada unsur PGE, unsur lain juga dikenalpasti terutamanya unsur yang dijangkakan mempunyai perkaitan dengan aktiviti trafik.

3. Hasil dan Pembahasan

Keputusan analisis unsur PGE dalam sampel debu jalan di UKM/ Bandar Baru Bangi diberikan dalam Jadual 1. Hasil kajian menunjukkan hanya Pt dan Rh yang hadir dalam sampel debu jalan manakala Pd tidak dapat dikesan dalam kesemua sampel yang dikaji. Julat kepekatan bagi masing-masing Pt dan Rh dalam debu jalan adalah di antara 1.2 hingga 116.3 ppb dan 1.8 hingga 171.4 ppb dengan kawasan kawalan menunjukkan

kepekatan terendah. Keputusan analisis sampel debu jalan di lokasi persampelan Lembah Kelang/ Kuala Lumpur pula menunjukkan kepekatan logam Pt pada julat TDK hingga 475 ppb manakala kandungan logam Rh pula berada pada julat TDK hingga 125 ppb (Jadual 2). Logam Pd tidak dapat dikesan pada semua sampel manakala logam Pt dan Rh hanya dapat dikesan dalam beberapa sampel sahaja.

Pada amnya keputusan kajian awal ini menunjukkan terdapatnya hubungan antara kandungan Pt dengan lokasi atau ketumpatan trafik kerana kandungan tertinggi yang ditemui dalam kajian ini adalah bagi kawasan Plaza tol Kajang, Plaza Tol Gombak dan Pos Kawalan Genting Highland. Namun bagi Rh kaitan antara kepekatan dengan lokasi atau ketumpatan kenderaan sukar dilihat kerana terdapat keadaan dimana Rh ditemui tinggi dilokasi dimana Pt tidak dapat dikesan. Kajian yang lebih lengkap yang dijalankan di German (Schafer et. al 1999) menunjukkan bahawa julat kandungan masing-masing Pt, Rh dan Pd dalam sampel debu jalan adalah 112 – 166 ppb, 16.6 – 43.3 ppb dan TDK – 27.2 ppb. Kajian mereka juga dapat mengaitkan antara kepekatan PGE dengan ketumpatan trafik. Dalam kajian penentuan PGE di dalam sampel debu jalan di kawasan terowong di Poland pula mendapati kandungan Pt merupakan yang paling tinggi iaitu sebanyak 34.2 hingga 110.9 ngg^{-1} manakala kandungan Rh pula sebanyak 6.0 hingga 19.7 ngg^{-1} (Lesniewska et al. 2004). Selain ketumpatan trafik, perubahan suhu pada julat tinggi, kelajuan kenderaan dan usia penukar bermangkai juga dilaporkan mempengaruhi jumlah pembebasan unsur PGE daripada penukar bermangkai (Ely et al. 2001).

Keputusan analisis PGE dalam sampel rumput bagi kawasan UKM/Bandar Baru Bangi ditunjukkan dalam Jadual 3. Kepekatan Pt yang dapat dikesan berada dalam julat 2.50 hingga 16.30 ppb dengan dua sampel dari kampus UKM menunjukkan kepekatan tertinggi iaitu 60.0 dan 102.5 ppb, manakala kandungan Rh yang dapat dikesan berada dalam julat kepekatan 5.0 hingga 33.8 ppb. Sepertimana dalam sampel debu jalan, Pd juga tidak dapat dikesan dalam kesemua sampel rumput yang diuji. Keputusan kajian awal ini didapati lebih tinggi berbanding kajian yang dijalankan di USA dimana kandungan masing-masing Pt, Pd dan Rh dalam sampel rumput di kawasan jalan

Jadual 1. Analisis kepekatan PGE dalam sampel debu jalan UKM/ Bandar Baru Bangi menggunakan ICP-MS

Lokasi Persampelan	Kepekatan Logam PGE (ppb, ngg ⁻¹)		
	Pt	Pd	Rh
Seksyen 9	3.55	TDK*	3.75
	3.45	TDK	29.50
Bulatan Fasa 1	4.40	TDK	171.35
	2.35	TDK	23.30
Bulatan Fasa 4	4.40	TDK	10.30
	15.20	TDK	4.25
Kampus UKM	5.90	TDK	8.85
	4.35	TDK	8.60
	20.50	TDK	6.60
Plaza Tol Bangi	2.75	TDK	4.50
	13.50	TDK	121.40
Plaza Tol Kajang	15.40	TDK	14.60
	116.25	TDK	20.80
Stesen kawalan	1.20	TDK	1.75

* TDK = tidak dapat dikesan

Jadual 2. Analisis kepekatan PGE dalam sampel debu jalan Lembah Kelang/ Kuala Lumpur menggunakan ICP-OES

Lokasi Persampelan	Kepekatan Logam PGE (ngg ⁻¹)		
	Pt	Pd	Rh
Jalan Ampang	25	TDK*	25
	200	TDK	75
Plaza Tol Gombak	300	TDK	100
	100	TDK	50
Kawasan Rehat Genting Sempah	TDK	TDK	50
	TDK	TDK	50
Pos Kawalan Genting Highland	100	TDK	TDK
	300	TDK	TDK
	475	TDK	25
Bukit Tinggi	TDK	TDK	100
	TDK	TDK	125
Bandar Seri Putra	TDK	TDK	25
	TDK	TDK	50

* TDK = tidak dapat dikesan

bertol adalah 1.23 – 1.69 ppb, 0.97 – 1.03 ppb dan 0.10 – 0.12 ppb (Ely et. al., 2001). Walaupun laporan menunjukkan penggunaan penukar bermangkin yang semakin meluas membantu mengurangkan pencemaran udara tetapi pada masa yang sama ia telah menyebabkan pertambahan kandungan unsur PGE ke dalam persekitaran.

Selain dari PGE, kajian turut mengesan kehadiran unsur Cu, Ni, Pb dan Zn yang mempunyai kaitan dengan aktiviti trafik di lokasi persampelan. Keputusan penentuan

unsur ini diberikan dalam Jadual 4. Secara ringkasnya julat kepekatan masing-masing Cu, Ni, Pb dan Zn adalah 102.6 – 5686.3 ppb, 5.6 – 943.8, 217.4 – 15244.15, 14.8 – 705.1 ppb. Pada amnya keputusan kajian menunjukkan semakin tinggi ketumpatan trafik maka semakin tinggi kandungan keempat-empat unsur ini. Sebagai contoh, di Plaza Tol Kajang semua unsur yang dikaji menunjukkan kepekatan yang berlipat kali ganda berbanding lain-lain lokasi.

Jadual 3. Analisis kepekatan PGE dalam sampel rumput UKM/ Bandar Baru Bangi menggunakan ICP-MS

<i>Lokasi Persampelan</i>	Kepekatan Logam PGE (ngg⁻¹)		
	Pt	Pd	Rh
Seksyen 9	5.00	TDK	7.50
	3.80	TDK	6.30
Bulatan Fasa 1	3.80	TDK	12.50
	12.50	TDK	8.80
Bulatan Fasa 4	5.00	TDK	8.80
	5.00	TDK	5.00
Kampus UKM	12.50	TDK	5.00
	2.50	TDK	7.50
	102.50	TDK	17.50
Plaza Tol Bangi	5.00	TDK	13.80
	16.30	TDK	6.30
Plaza Tol Kajang	3.80	TDK	5.00
	5.0	TDK	7.50
Stesen kawalan	60.00	TDK	33.80

Jadual 4. Analisis kepekatan Cu, Ni, Pb dan Zn dalam sampel debu jalan UKM/ Bandar Baru Bangi menggunakan ICP-MS.

<i>Lokasi Persampelan</i>	Kepekatan Unsur (ngg⁻¹)			
	Cu	Ni	Pb	Zn
Seksyen 9	147.71	9.80	1209.55	261.73
	118.09	10.15	799.89	111.67
Bulatan Fasa 1	321.29	31.98	2795.49	147.07
	1079.06	18.12	1522.69	192.05
Bulatan Fasa 4	306.90	18.72	481.32	104.22
	102.58	9.71	428.54	71.48
Kampus UKM	555.17	22.39	1183.32	190.91
	601.90	53.72	2358.41	151.72
	216.66	11.70	236.46	30.70
Plaza Tol Bangi	136.61	12.69	996.79	59.56
	1512.13	63.44	5137.34	465.80
Plaza Tol Kajang	5686.27	95.28	15244.15	546.87
	3500.46	943.76	5008.39	705.08
Stesen kawalan	157.73	5.56	217.44	14.83

4. Kesimpulan

Kajian awal yang dijalankan ini pada amnya menunjukkan kehadiran Pt dan Rh yang telah dapat dikesan dalam sampel debu jalan dan rumput dikawasan kajian manakala Pd masih belum dapat dikesan. Kandungan Pt dan Rh dalam sampel debu jalan UKM/ Bandar Baru Bangi berada di dalam julat kepekatan 1.2 hingga 116.3 ppb dan 1.8 hingga 171.2 ppb masing-masing, manakala kandungan masing-masing Pt dan Rh di dalam sampel debu jalan Lembah Kelang/ Kuala Lumpur pula berada di dalam julat 25 hingga 475 ppb dan 25 hingga 125 ppb. Keputusan kajian ini juga

menunjukkan terdapat perkaitan antara kandungan PGE dengan ketumpatan trafik dikawasan kajian dan PGE juga didapati hadir dalam sampel rumput. Maka kajian lanjut adalah perlu bagi mendapat lebih banyak data bagi meramalkan impak PGE terdapat alam sekitar negara.

5. Ucapan terima kasih

Ribuan terima kasih dirakamkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana membiayai kajian dan pembentangan kertas ini.

6. Daftar Pustaka

Barefoot, R. R. 1997. Determination of Platinum at Trace Levels in Environmental and Biological

- Materials. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31** : 309-314.
- Brains, M. 2001. What Is A Catalytic Converter And How Does One Work? (atas talian <http://auto.howstuffworks.com/question66.htm>. (27 Jun 2004).
- Ely, J. C., Neal, C. R., Kulpa, C. F., Schneegurt, M. A., Seidler, J. A. & Jain, J. C. 2001. Implication of Platinum-Group Element Accumulation Along U.S. Roads From Catalytic-Converters Attrition, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35** : 3816-3822.
- Jarvis, K. E., Parry, S. J. & Piper, J. M. 2001. Temporal and Spatial Studies of Autocatalyst-Derived Trace Elements in the Environment. *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35** : 1031-1036.
- Lesniewska, B. A., Godlewska-Zylkiewicz, B., Bocca, B., Cairni, S., Caroli, S. & Hulanicki, A. 2004. Platinum, Palladium and Rhodium Content in Road Dust, Tunnel Dust and Common Grass in Bialystok Area (Poland): A Pilot Study. *Science of Total Environment*, 2004, **321** : 93-104
- Moldovan, M., Rauch, S., Gomez, M., Palacios, M. A. & Morrison, G. M. 2001. Bioaccumulation of Palladium, Platinum and Rhodium from Urban Particulates and Sediments By the Freshwater Isopod *Asellus Aquaticus*, *Wat. Res.*, 2001, **35**, :4175 – 4183.
- Ravindra, K., Bencs, L. & Grieken, R. V. 2004. Platinum group elements in the environment and their health risk. *The Science of the Total Environmen.*, 2004, **318** : 1-43.
- Schafer, J., Eckhardt, J. D., Berner, Z. A. & Stuben, D. 1999. Time-Dependent Increase of Traffic-Emitted Platinum-Group Elements (PGE) in Different Environmental Compartments. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33** : 3166-3170.
- The National Research Council. 1977. *Platinum-Group Metals*. Washington D.C. : National Academy of Sciences.
- Tuit, C. B., Ravissa, G. E. & Bothner, M. H. 2000. Antropogenic Platinum and Palladium in The Sediments of Boston Harbor. *Environ Sci. Technol.*, 2000, **34** : 927-932.
- Zereini, F., Skerstupp, B., Alt, F., Helmers, E & Urban, H. 1997. Geochemical Behaviour of Platinum-Group Elements (PGE) in Particulate Emissions by Automobile exhaust catalysts: experimental results and environmental investigations. *The Science of the Total Environment*, 1997, **206** : 137-146.

Ekstraksi Enzimatis Santan Suatu Upaya Menghasilkan Minyak Kelapa dengan Kandungan *Medium Chain Triglycerides* Tinggi.

Amril Latif

Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Terbuka

Abstrak

Asam Lemak Rantai Medium (Medium Chain Fatty Acid) merupakan asam lemak yang sangat bermanfaat untuk kesehatan, sebagian besar asam lemak ini terkandung dalam minyak kelapa dalam bentuk trigliserida rantai medium (medium chain triglycerides). Minyak kelapa yang mengandung medium chain triglycerides (MCT) dapat diekstraksi dari santan, dengan beberapa metode diantaranya adalah ekstraksi enzimatik (aqueous extraction).

Tujuan penelitian adalah memperoleh enzim yang mampu mengekstraksi santan guna menghasilkan minyak kelapa dengan kandungan MCT tinggi. Untuk mencapai tujuan dilakukan optimasi konsentrasi, pH, suhu dan waktu inkubasi terhadap ragi tempe, enzim α -amilase, papain, dan bromelin dengan medium santan. Kandungan MCT minyak kelapa hasil ekstraksi, dianalisis kandungan MCT-nya dengan gas kromatografi.

Hasil optimasi konsentrasi menunjukkan jumlah optimum ragi tempe, enzim α -amilase, enzim papain, dan enzim bromelin masing-masing adalah 1,64 gram; 2,22 gram; 1,20 gram; dan 0,60 gram. Suhu ekstraksi optimum adalah 60 °C kecuali untuk enzim α -amilase 70 °C. Sedangkan pH medium dapat digunakan pH santan yaitu pH 6. Waktu inkubasi optimum bagi semua enzim dan ragi adalah 18 jam. Ragi tempe mampu menghasilkan minyak kelapa dengan rendemen paling tinggi, yaitu sebesar 61,87%; Analisis gas kromatografi memperlihatkan total kandungan MCT paling tinggi diperoleh dalam minyak hasil ekstraksi dengan enzim papain, yaitu 57,5%. Sedangkan perolehan MCT secara total rendemen yang tertinggi dihasilkan oleh ragi tempe, yaitu sebesar 45,6%.

Kata kunci : medium chain triglycerides, ekstraksi enzimatik, minyak kelapa, ragi tempe, enzim papain.

1. Pendahuluan

Medium Chain Triglycerides (MCTs) yang tersusun dari gliserol dan asam lemak rantai medium (MCFA) merupakan fraksi asam lemak terbesar yang ada di dalam minyak kelapa. Asam lemak rantai medium yang menyusun MCTs tersebut adalah asam lemak oktanoat, dekanoat, dan laurat dan merupakan asam lemak yang sangat besar manfaatnya untuk kesehatan seperti mengatasi mal absorpsi asam lemak rantai panjang (Brand 1990), minyak yang bermanfaat sebagai antimikrobal (Enig 2003), lemak rendah kalori, minyak yang sehat untuk penderita diabetes melitus, sebagai penghasil energi, dan mengurangi berat badan (Five 2003).

Agar potensi MCTs yang terdapat dalam minyak kelapa tersebut dapat dimanfaatkan secara maksimal, maka perlu diketahui cara-cara ekstraksi minyak kelapa dari daging kelapa atau santan yang mampu menghasilkan minyak kelapa dengan kandungan *medium chain-triglycerides* tinggi

Salah satu cara ekstraksi minyak kelapa dari daging kelapa atau santan yang akhir-akhir ini banyak diteliti adalah penggunaan enzim dan disebut ekstraksi enzimatis, seperti penggunaan enzim karbohidrase yang pernah dilakukan oleh Bih-King Cheng *et al.* (2002) dengan menggunakan enzim GamanaseTM 1.0L dengan rendemen minyak yang dihasilkan 84%, Tano-Debrah *et al.* (1997) dengan menggunakan

enzim protease, selulase dan hemiselulase dengan rendemen minyak yang dihasilkan 65%, Che Men *et al.* (1996) dengan enzim protease, selulase dan α -amilase dengan rendemen yang dihasilkan 73%, Christensen & Olsen (1990) dengan menggunakan enzim poligalakturonase, galaktomanase dan SP-249 (polisakaridase) dengan rendemen minyak yang dihasilkan 81%, dan penggunaan enzim protease seperti yang dilakukan oleh Siregar (1987) menggunakan enzim papain 6 ppm menghasilkan minyak dengan rendemen 47,69%, Tiarawaty (1996) menggunakan enzim bromelin dari buah nanas menghasilkan minyak dengan rendemen 22,42%, Jadri (1986) menggunakan lumutan daun pepaya menghasilkan minyak dengan rendemen 17,9%.

Dalam penelitian ini diaplikasikan ragi tempe, enzim α -amilase, papain, dan bromelin dengan perlakuan meliputi optimasi konsentrasi, pH, suhu dan waktu inkubasi. Minyak kelapa yang diperoleh dianalisis komposisi dan persentase asam lemak rantai mediumnya dengan gas kromatografi.

Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan kondisi optimum ragi tempe dan 3 jenis enzim, yang meliputi konsentrasi, pH, suhu dan waktu inkubasi untuk mengekstraksi santan guna menghasilkan minyak kelapa dengan rendemen tinggi.
2. Mengetahui komposisi dan persentase *medium-chain triglycerides* yang terkandung dalam minyak kelapa dari santan hasil ekstraksi oleh ragi tempe dan 3 jenis enzim
3. Memperoleh enzim yang mampu mengekstraksi santan dengan kandungan *medium-chain triglycerides* tinggi.

2. Percobaan

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei sampai Desember 2003. Uji aktivitas enzim, optimasi konsentrasi, pH, suhu dan waktu inkubasi enzim dilakukan di Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong, sedangkan untuk analisis kandungan asam lemak rantai medium yang

terdapat pada minyak kelapa hasil ekstraksi dari keempat enzim dilakukan di Laboratorium Kimia Pangan Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

Bahan baku, Bahan kimia, Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging kelapa segar, diperoleh dari pasar Prumpung Parung Bogor. Bahan kimia yang digunakan adalah ragi tempe dengan merek Raprima diproduksi oleh PT. Aneka Fermentasi Industri Bandung-Indonesia, enzim papain diperoleh dan diproduksi oleh Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong, enzim bromelin dan enzim amilase produksi Sigma, serta bahan kimia lainnya seperti: heksan, HCl, NaOH, NaHPO_4 , NaH_2PO_4 , phenolphthalein, asam asetat glasial, dan asam sulfat. Alat yang digunakan neraca analitik, sentrifius, labu Kjedahl, water bath, soklet ekstraksi, spektrofotometri, dan gas kromatografi.

Metode Penelitian

Pada tahap pendahuluan dilakukan uji bahan baku (kelapa parut) meliputi: uji kadar air dengan prosedur analisis A.O.A.C., 1981, kadar lemak dengan prosedur A.O.A.C., 1981 dan kadar protein AOAC, 1984, pada tahap ini juga dilakukan uji aktivitas enzim terhadap ragi tempe, alfa amilase dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi, enzim papain dan bromelin dengan menggunakan metode Berg. Meyer, H.U. dan Grassi, M (1983).

Tahap kedua merupakan tahap optimasi pada tahap ini ragi tempe dan enzim yang telah diuji aktivitasnya diaplikasikan pada 200 ml santan, optimasi pertama adalah optimasi konsentrasi pada tahap ini jumlah ragi tempe dan enzim yang digunakan disesuaikan dengan jangkauan kerja enzim masing-masing. Jumlah ragi tempe dan enzim yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.

Selanjutnya adalah optimasi pH, suhu, dan waktu inkubasi, pH dikondisikan pada pH 4, 5, 6, dan 7 penkondisian pH didasarkan bahwa enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH 4,5 sampai 8,0 (Muchtadi 1992). Suhu dikondisikan 40 °C, 50 °C, 60 °C, dan 70 °C penkondisian suhu tersebut didasarkan kepada enzim yang mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran suhu yang disebut suhu optimum yang umumnya antara 40 °C sampai 70 °C (Muchtadi 1992). Waktu

Tabel 1. Jumlah enzim yang digunakan.

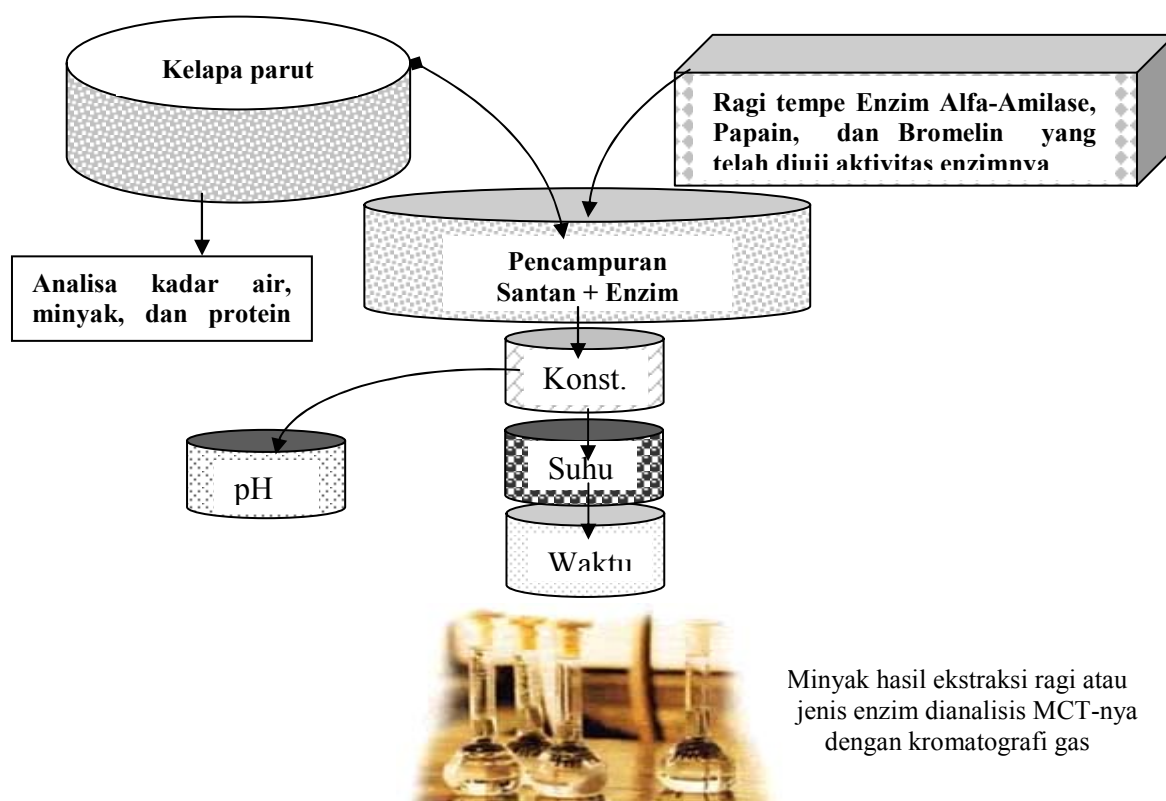
Konsentrasi	Ragi		α -Amilase		Papain		Bromelin	
	Unit	Gram	Unit	Gram	Unit	Gram	Unit	Gram
1X	50	0,82	250	0,27	250	0,30	250	0,15
2X	100	1,64	500	0,55	500	0,60	500	0,30
4X	200	3,28	1000	1,11	1000	1,20	1000	0,60
8X	400	6,56	2000	2,22	2000	2,40	2000	1,20

inkubasi dikondisikan 6 jam, 12 jam, 18 jam dan 24 jam penkondisian waktu inkubasi yang dimulai dari waktu inkubasi 6 jam karena di bawah 6 jam berdasarkan pengamatan belum terbentuk minyak.

Tahap ketiga analisis komposisi serta persentase kandungan asam lemak rantai medium yang terkandung pada minyak hasil perlakuan waktu inkubasi dari ragi tempe, α -amilase, papain maupun oleh bromelin dengan gas kromatografi. Pada tahap ini metil ester asam lemak yang telah dibebaskan dari kandungan air dengan natrium sulfat anhidrat dan telah dipekatkan dengan gas nitrogen disuntikan ke alat Kromatografi Gas GC-9AM

sebanyak 1 μ l. Alat kromatografi Gas tersebut dilengkapi dengan detektor FID, integrator Chromatopac C-R6 dan kolom kapiler DB-23 (30 m X 0,25 mm id; J & W Scientific, Folsom, CA). Suhu injector diatur 250 $^{\circ}$ C dan suhu detektornya 260 $^{\circ}$ C. Suhu awal kolom 140 $^{\circ}$ C yang dipertahankan selama 6 menit dengan laju kenaikan suhu 30 $^{\circ}$ C/menit. Suhu akhir kolom diatur 230 $^{\circ}$ C dan dipertahankan selama 25 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah gas helium dengan tekanan 1 kg/cm² dan detektor FID. Tekanan gas hidrogen dan tekanan udara diatur sampai 0,5 kg/cm².

Tahap-tahap yang dilakukan di atas dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir penelitian

Tabel 2. Persentase kadar air, minyak, dan protein bahan baku

Nutrisi bahan baku yang dianalisis	Bobot basah		Bobot kering	
	Referensi ¹⁾	Sampel	Referensi ²⁾	Sampel
Air	50	51,28		
Minyak	34	34,3	66,84	68,69
Protein	3,5	3,64	8,03	9,617

¹⁾ Bailey 1996 ²⁾ Siahaan 1993

Tabel 3 . Aktivitas enzim dari ragi tempe, α -amilase, papain, dan bromelin.

Aktivitas	Enzim			
	Ragi Tempe	α -amilase	Papain	Bromelin
Protease	- *	- *	830 U/gr	1697,1 U/gr
Karbohidrase α 1,4 glikosida	60,95 U/gr	897,13 U/gr	- *	- *

- Tidak dilakukan.

3. Hasil dan Pembahasan Analisis Bahan Baku

Analisis bahan baku bertujuan untuk mengetahui kelayakan bahan baku yang digunakan. Hasil analisis bahan baku dapat dilihat pada tabel 2.

Dari data yang tersaji pada tabel 2 menunjukkan bahan baku yang dianalisis layak untuk dijadikan bahan baku penelitian.

Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim (U/gr) didefinisikan sebagai jumlah suatu enzim yang mengkatalisis perubahan 1 mikromol substrat per menit pada kondisi temperatur, pH, dan konsentrasi substrat optimal. (Robert C. King 2002). Dengan merujuk kepada definisi tersebut telah dilakukan uji aktivitas enzim yang digunakan yaitu meliputi uji aktivitas karbohidrase dan protease. Hasil pengujiannya dapat dilihat pada tabel 3.

Aktivitas enzim yang diaplikasikan dalam penelitian ini setara dengan yang diproduksi oleh MDidea (2004). Sebagai contoh aktivitas enzim papain yang digunakan pada penelitian ini 830 U/g sedangkan yang diproduksi oleh MDidea memiliki aktivitas antara 600 – 1000 U/g. Hal yang sama diungkapkan oleh Suhartono (1992) dimana aktivitas proteolitik kasar dari papain adalah 70 – 500 U/g, sedang yang murni bekisar antara 70 – 1000 U/g. Berdasarkan penelitian ini enzim yang

digunakan layak untuk diaplikasikan. Selanjutnya untuk mengetahui kondisi optimal aktivitas enzim dalam media santan dilanjutkan dengan tahap optimasi.

Optimasi Aktivitas Enzim

Banyak faktor yang mempengaruhi aktivitas suatu enzim, beberapa faktor utamanya adalah konsentrasi, suhu, pH (Campbell *et al.* 2002) dan lama waktu inkubasi Faktor tersebut dapat mempengaruhi struktur tersier protein enzim yang tentunya juga akan mempengaruhi laju reaksi enzim (Marks *et al.* 1996). Untuk itulah dilakukan optimasi terhadap pengaruh konsentrasi, pH, suhu dan waktu inkubasi.

Optimasi Konsentrasi

Pada penelitian ini akan diujikan pengaplikasian konsentrasi enzim 1X, 2X, 4X, dan 8X dari kisaran aktivitas masing-masing enzim, dengan jumlah enzim yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1. Rendemen minyak yang dihasilkan dari inkubasi masing-masing ragi dan enzim di dalam 200 ml santan terlihat pada gambar 2.

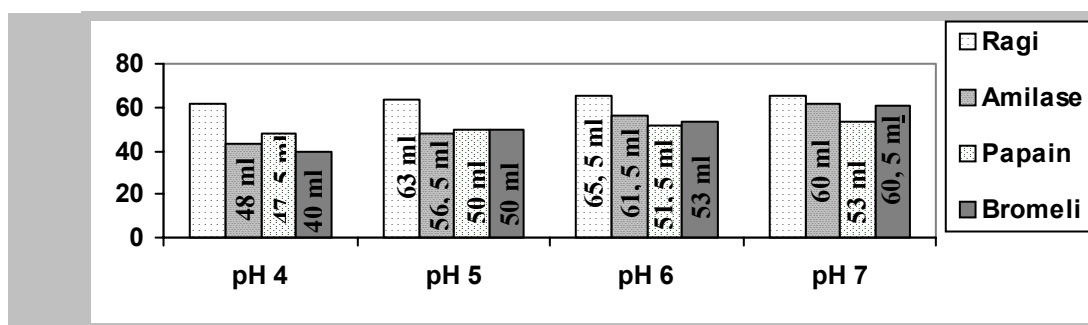
Berdasarkan analisis statistik terhadap data pada gambar 2 diketahui bahwa ragi tempe memberikan rendemen tertinggi pada konsentrasi 2X, enzim α -amilase pada konsentrasi 8X sementara itu untuk enzim papain dan bromelin karena konsentrasi 4X dan 8X tidak berbeda nyata, maka untuk optimasi lebih lanjut enzim papain dan bromelin yang dipakai adalah konsentrasi 4X,

sehingga dengan demikian dapat ditentukan jumlah ragi dan enzim yang digunakan untuk optimasi lebih lanjut, yaitu untuk: ragi tempe 1,64 gram, enzim α -amilase 2,22 gram, papain 1,20 gram dan enzim bromelin 0,60 gram.

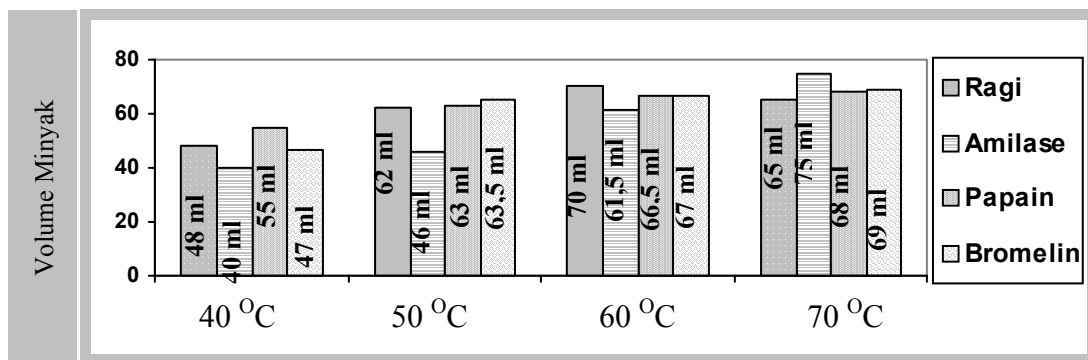
Dari data yang tersaji pada gambar 2 juga dapat diketahui bahwa ragi tempe walaupun mempunyai aktivitas terendah dibanding dengan enzim lainnya mampu menghasilkan minyak dengan rendemen tinggi. Hal ini dimungkinkan karena ragi tempe mempunyai jenis kapang *Rhizopus oligoporus* atau *Rhizopus oryzae* (Srikandi 1989), kapang tersebut menghasilkan enzim α -amilase, β -amilase, glukamilase, pektinase, dan lipase (Muchtadi 1992). Enzim β -amilase merupakan enzim yang berkemampuan memutus ikatan β -

tersusun dari sejumlah asam amino mempunyai sifat ionik gugus karbonil dan gugus amino, sifat ionik itu mudah dipengaruhi oleh pH (Campbell *et al.* 2002). Selain itu pH juga dapat menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim menjadi berubah. Perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim (Campbell *et al.* 2002). Untuk itulah dalam penelitian ini optimasi pH dilakukan. Data dari optimasi pH terlihat pada gambar 3.

Analisis statistik yang dilakukan terhadap data pada gambar 3 menunjukkan bahwa perlakuan pH 5, pH 6 dan pH 7 tidak menunjukkan perbedaan nyata, hal tersebut karena enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH 4,5 sampai 8,0 (Muchtadi 1992). Namun



Gambar 3. Rendemen yang diperoleh dari beberapa taraf perlakuan pH.



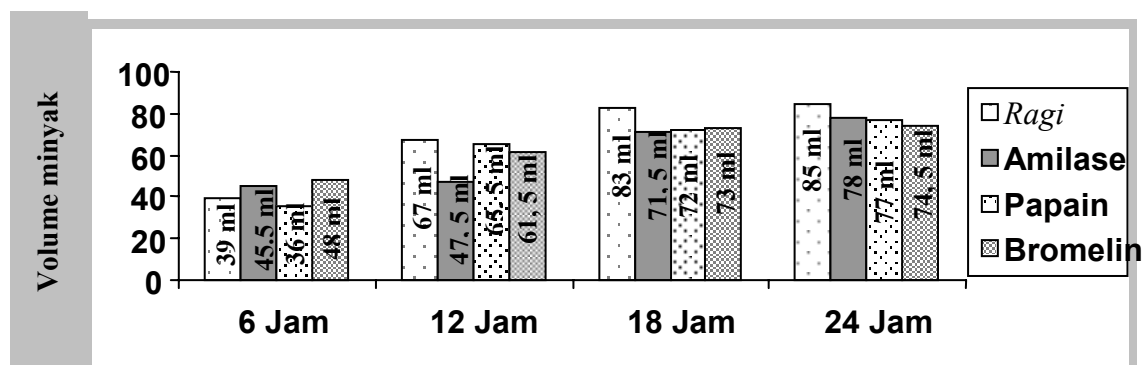
Gambar 4. Rendemen yang diperoleh terhadap perlakuan suhu

1,4 glikosida pada polisakarida. Polisakarida merupakan struktur dinding sel daging kelapa dimana minyak berada, sementara itu enzim yang lain tidak mempunyai kemampuan memutus ikatan β -1,4 glikosida.

Optimasi pH

pH juga berpengaruh pada aktivitas enzim, sebagaimana telah diketahui bahwa enzim yang

demikian karena rendemen minyak yang diperoleh lebih rendah dibanding dengan perlakuan konsentrasi maka untuk optimasi lebih lanjut perlakuan pH diabaikan dan pH larutan yang digunakan adalah pH santan kelapa itu sendiri, yaitu pH 6. Pada pH tersebut ragi tempe dan ketiga enzim lainnya mampu beraktivitas dengan baik.



Gambar 5. Rendemen yang diperoleh dari perlakuan waktu inkubasi

Optimasi suhu enzim

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim juga sensitif terhadap suhu, enzim sebagai protein akan mengalami denaturasi jika suhunya dinaikan di atas suhu optimalnya (Campbell *et al.* 2002). Untuk itu perlu diketahui suhu optimal dari masing-masing enzim yang akan diaplikasikan, hasil uji terhadap perlakuan suhu enzim disajikan dalam gambar 4.

Analisis statistik terhadap data gambar 4 menunjukkan perlakuan suhu 50 °C, 60 °C, dan 70 °C untuk ragi tempe, enzim papain, dan bromelin tidak berbeda nyata kecuali untuk enzim α -amilase. Dari data tersebut juga terlihat enzim α -amilase pada suhu 70 °C memberikan hasil tertinggi dibandingkan enzim lainnya. Enzim α -amilase mempunyai berat molekul sekitar 50 kD dan setiap molekul mengandung satu gram atom kalsium, dengan adanya kalsium yang berikatan dengan molekul enzim menyebabkan terbentuknya ikatan elektrostatis atau ikatan ionik, ikatan inilah yang menyebabkan enzim tahan terhadap pengaruh suhu dan pH (Muchtadi 1992) sehingga lebih kompetitif dibanding enzim lainnya.

Optimasi Waktu Inkubasi

Pada perlakuan waktu inkubasi faktor konsentrasi dan suhu diintegrasikan sedangkan faktor pH diabaikan dan pH larutan yang digunakan adalah pH santan kelapa itu sendiri, yaitu pH 6. Pada perlakuan waktu inkubasi diaplikasikan 4 macam perlakuan waktu yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam pertimbangan perlakuan waktu dimulai dari 6 jam karena berdasarkan pengamatan langsung ragi maupun

enzim mulai efektif bekerja setelah 6 jam. Hasil perlakuan waktu inkubasi dapat dilihat pada gambar 5.

Analisis statistik terhadap data perlakuan waktu inkubasi untuk ragi tempe, enzim papain, dan bromelin menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan waktu inkubasi 18 jam dengan 24 jam tidak berbeda nyata. Untuk ragi tempe dan 3 jenis enzim waktu inkubasi 24 jam memberikan rendemen dengan volume minyak yang dihasilkan masing-masing 61,87%; 56,77%; 56,05%; dan 54,23%. Sementara itu penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bih-King Cheng *et al.* (2002) dan Christensen & Olsen (1990) dengan menggunakan enzim karbohidrase masing-masing menghasilkan minyak dengan rendemen 84% dan 81%, sedangkan penggunaan enzim protease seperti yang dilakukan oleh Siregar (1987) dan Tiarawaty (1996) masing-masing menghasilkan minyak dengan rendemen 47,69% dan 22,42%.

Dari hasil optimasi konsentrasi, pH, dan waktu inkubasi dapat ditentukan bahwa ragi tempe memberikan rendemen tertinggi diikuti oleh enzim α -amilase. Dengan demikian dapat ditentukan kondisi optimum dari ragi tempe dan 3 jenis enzim, yaitu : ragi tempe konsentrasi 1,64 gram, pH 6, suhu 60 °C dan waktu inkubasi 18 jam, α -amilase konsentrasi 2,22 gram, pH 6, suhu 70 °C dan waktu inkubasi 18 jam, papain konsentrasi 1,20 gram, pH 6, suhu 60 °C dan waktu inkubasi 18 jam, bromelin konsentrasi 0,60 gram, pH 6, suhu 60 °C dan waktu inkubasi 18 jam.

Rendemen Minyak yang Dihasilkan

Dari penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ragi tempe mampu mengekstraksi santan untuk menghasilkan minyak dengan rendemen tertinggi dibanding enzim lainnya, yaitu 85 ml atau 61,87%. Hal tersebut dapat terjadi karena ragi tempe memiliki jenis kapang *Rhizopus oligosporus* atau *Rhizopus oryzae* (Srikandi 1989). Kapang *Rhizopus* sp. dalam proses metabolitnya menghasilkan enzim α -amilase, β -amilase, glukamilase, pektinase, dan lipase (Muchtadi 1992), enzim α -amilase, β -amilase, glukamilase merupakan enzim pemutus ikatan glikosida. Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Balasubramaniam (1976) & Saittagaroon (1982) diketahui bahwa 34,38% struktur sel daging kelapa segar adalah polisakarida yang tersusun atas: galaktomanan 61%, mannan 26%, dan selulosa 13%. Polisakarida itu mampu dihidrolisis oleh enzim α -amilase, β -amilase, glukamilase yang terdapat pada ragi tempe.

Kandungan Asam Lemak

Analisis kandungan *Medium Chain Triglycerides* yang ada pada minyak hasil ekstraksi dari ragi tempe dan 3 jenis enzim dilakukan dengan menggunakan gas kromatografi. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa ekstraksi dengan enzim papain dapat menghasilkan satuan minyak dengan kandungan MCT lebih tinggi dibanding enzim lainnya, yaitu 57,25%. Namun bila perhitungan MCT itu didasarkan kepada rendemen minyak hasil optimasi waktu inkubasi maka MCT total untuk ragi tempe menjadi = 45,60%, α -amilase = 40,83%, papain = 44,08%, dan bromelin = 39,15%. Sementara itu Bailey (1996) dengan menggunakan pelarut ekstraksi n-heksana menyatakan kandungan asam lemak rantai

medium pada minyak kelapa untuk asam lemak oktanoat (6 – 9 %), dekanat (6 – 10 %), dan laurat (46 – 50 %)

Dengan demikian hasil ekstraksi menggunakan ragi dan 3 jenis enzim tersebut sedikit lebih rendah bila dibandingkan dengan Bailey (1996) akan tetapi proses ekstraksi dengan menggunakan solvent n-heksana yang digunakan Bailey (1996) mempunyai beberapa keburukan yaitu mudah terbakar, mudah meledak, sedikit beracun, dan mempunyai dampak lingkungan yang kurang baik.(Cater *et al.* 1974).

Selanjutnya bila ditinjau dari klasifikasi enzim bahwa enzim papain dan bromelin merupakan enzim yang sama-sama kelompok protease sulfhidril, enzim bromelin justru menghasilkan MCT paling rendah sementara enzim papain paling tinggi. Perbedaan itu mungkin dapat dijelaskan berdasarkan struktur enzim bromelin yang merupakan glikoprotein yang mengandung 3 mol manosa, 1 mol fruktosa, 1 mol xylosa, dan 2 mol N – asetil glukosamin (Muchtadi 1992). Enzim bromelin mempunyai gugus pokok asam amino protein dan gugus karbohidrat sebagai gugus prostetik. Adanya gugus prostetik karbohidrat dalam enzim tersebut lebih menampakkan ciri bromelin yang berbeda dengan papain. Bromelin merupakan glikoprotein sedangkan papain tidak demikian, adanya perbedaan tersebut diduga menyebabkan aktifitas enzim berbeda.

4. Kesimpulan

Jumlah optimum ragi, α -amilase, papain, dan bromelin untuk mengekstraksi minyak dari santan kelapa masing-masing adalah 1,64 gram, 2,22 gram, 1,20 gram, dan 0,60 gram. suhu ekstraksi optimum adalah 60 °C kecuali untuk α -amilase 70 °C. sedangkan pH medium dapat digunakan pH santan, yaitu pH 6. Waktu

Tabel 4. Persentase asam lemak rantai medium hasil ekstraksi

Asam Lemak Rantai Medium	Persentase Asam lemak Rantai Medium Ekstraksi			
	Ragi	α -amilase	Papain	Bromelin
Oktanoat C ₈ H ₁₆ O ₂	7,0	7,2	7,55	7,05
Dekanoat C ₁₀ H ₂₀ O ₂	5,0	5,0	5,45	5,8
Laurat C ₁₂ H ₂₄ O ₂	41,65	40,15	44,1	39,7
Total	53,65	52,35	57,25	52,55

inkubasi optimum bagi semua enzim dan ragi adalah 18 jam. Rendemen yang dihasilkan dari kombinasi kondisi perlakuan untuk ragi tempe, α -amilase, papain, dan bromelin masing-masing sebesar 61,87%; 56,77%; 56,05% ; dan 54,23%.

Berdasarkan analisis kromatografi gas total kandungan *medium chain triglycerides* tertinggi diperoleh pada minyak yang diekstraksi dengan enzim papain yaitu sebesar 57,5%, dengan komposisi asam lemak oktanoat 7,55%, dekanoat 5,45%, laurat 44,25% diikuti oleh ragi tempe 53,65% dengan komposisi asam lemak oktanoat 7,0%, dekanoat 5,0% dan laurat 41,6%, α -amilase 52,35%, dengan komposisi asam lemak oktanoat 7,2%, dekanoat 5,0%, laurat 40,15%, dan bromelin 52,55% dengan komposisi asam lemak oktanoat 7,05% dekanoat 5,8%, laurat 39,7%.

Jumlah *medium chain triglycerides* yang diperoleh berdasarkan rendemen dan total *medium chain triglycerides* terkandung dihasilkan dengan menggunakan ragi tempe pada kondisi ekstraksi 1,64 gram, pH 6, suhu 60 °C, dan waktu inkubasi 18 jam dengan total *medium chain triglycerides* terkandung 45,6%.

SARAN

Dari aspek aplikasi perlu diteliti efek sinergisme dari beberapa enzim dalam mengekstraksi minyak dari santan guna mengoptimalkan *medium chain triglycerides* . Sedangkan untuk memastikan kemampuan katalitik dan besar energi aktivasi yang dibutuhkan perlu dikaji lebih lanjut mekanikal kuantum dan mekanikal molekuler dari masing-masing enzim.

5. Daftar Pustaka

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Anal. Chem. Washington, D.C.

Arif, J. 1991. Mempelajari penggunaan bibit khamir roti secara berulang dalam ekstraksi minyak kelapa. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

Balasubramaniam, K. 1976. Polysaccharides of the kernel of maturing and matured coconuts. *Journal of Food Science* 41: 1370-1373

Bailey, A.E. 1996. Industrial Oil and Fat Products. Interscience Publisher Inc. NY.

Berg. Meyer, H.U. dan Grassi. M (1983). *Method of enzymatic analysis* vol.2

Bih-King Chen and Levente L. Diosady, 2002. Enzymatic Aqueous Processing of Coconuts, *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, 2003.1,1. p.55-61.

Brand G. 1990. Medium chain triglycerides. *J. Coconuts Today* Special issue.

Bruce five, 2000. The Health Benefits of Medium Chain Fatty Triglycerides. www.coconut-info.com 2003

Campbell, Neil and Jane B. Reece. 2002. *Biology*. 6th ed. Benjamin Cummings,

San Fransisco, CA. pp.96-102

Cater, C.M., Rhee, K.C., Hangenmaier, R.D., and Mattil, K.F.1974. Aqueous extraction-An alternative oilseed milling process. *Journal of the American Oil Chemists Society* 51:137-141.

Che Man, Y.B., Suhardiyono, Asbi, A.B., Azudin, M.N., and Wei, L.S. 1996. Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*73:683-686

Christensen, F.M. and Olsen, H.A.S. 1990. U.S. Patent 4, 904,483.

Dendi,D.A.V. dan W.H.Timmins. 1973. Development of Wet Coconut Process Designed To Extract Protein And Oil From Fresh Coconut. Tropical Product Institute-Foreign And Commonwealth Office, London.

Enig, Mary G. 1999. Coconut: in Suport of good health in the century. <http://www.apcc.org.sg/special.htm>.

International Union of Biochemistry (UB). 1961. *Report of the Commission on Enzymes*. Oxford: Pergamon Press

Jadri, A. 1986. Penggunaan papain sebagai pemecah emulsi dalam produksi minyak kelapa. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian. IPB, Bogor.

MDidea (2004) derrida@vip.163.com <http://www.mdidea.com> Exporting Division

Muchtadi, D dkk. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. PAU-IPB, Bogor.

Marks, Dawn B, et al. 1996. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Aproach. Temple University School of Medicine Philadelphia, Pennsylvania

Robert C. King and William D. Stansfield, Oxford University Press, New York, New York, 2002

Saittagaroon, S., Kawakishi, S., and Namiki M. 1983. Characterisation of polysaccharides of copra meal. *J.Sci. Food Agric.* 34.855-860.

Siregar, A.S, S.U. 1987. Pengaruh papain pada pembuatan minyak kelapa. PAU-UNSRI.

Amril Latif

- Srikandi, 1989. Mikrobiologi pangan. PAU-IPB, Bogor.
- Tano-Debrah, K. And Ohta, Y. 1997. Aqueous extraction of coconut oil by an enzyme assisted process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74: 497 – 502.
- Tiarawaty, R. 1996. Ekstraksi Minyak Kelapa dari Daging Kelapa Segar dengan Menggunakan Enzim Bromelin. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB
- Thieme, J.G. 1968. Coconut Oil Processing. FAO Agricultur Development, Rome.
- Suhartono MT. 1992. Protease. Bogor : IPB PAU Bioteknologi

Glyphosate Biodegradation Pathway On Using *E. Coli* and *Pseudomonas sp* Bacteria

Anna Permanasari, Zackiyah, Hokcu S., Ida I., and Dadan S.

Abstract

Pesticide biodegradation pathway is now an important subject that should be learned to assure that the degradation products are save for our environment. The pathway of glyphosates biodegradation on using *E. Coli* and *Pseudomonas sp* bacteria have been studied. The decreasing of glyphosate concentration was observed continually and the biodegradation products were monitored by HPLC and GC techniques. The result showed that *Pseudomonas sp* work better than *E. Coli* as biodegrader. *Pseudomonas sp* accelerated the rate of glyphosates biodegradation ± 15 times faster than natural biodegradation and ± 3 times faster than *E. Coli*. (glyphosate it self can be degraded naturally with $t_{1/2}$ 100 days). Moreover, glyphosates biodegradation followed sarcosine/glycine pathway, both on using *E. Coli* as well as *Pseudomonas sp* bacteria.

Key word. Pesticides, glyphosate biodegradation, biodegradation pathway, sarcosine, glycine.

1. Introduction

It is undeniable, that glyphosate as herbicide has given a large benefit to increase farm products. Unfortunately, because of its toxicity and resistency ($t_{1/2}$ 100 days), the uncontrolling use by farmer caused big problem for environment (Cox, 2002; Grandby, 2001; Leung, 2000; Schuette, 1998). Study on acceleration of pesticides degradation has been done, to solve the problem. Furthermore, it was also done the study to find out the pathway of biodegradation to assure that degradation products are save for environment.

The most popular method for pesticides degradation is biodegradation on using many kind of bacteria. Inskeep (1999) has got success to accelerate biodegradation of PCP, DDT and PCB with using white rot fungi microba. Robelisto (2002) had also studied the use of *Pseudomonas sp*, *Rhodococcus sp*, *Rhizibium sp* and *Agrobacterium Radiobacter* in atrazine biodegradation. Moreover, Pettit (1994), Cox (2002), and Shimadzu (2001) found that *Pseudomonas sp*, *Moraxella sp*, and *E.coli* used phosphates /phosphonates substances as the only one phosphorous resource.

Study on accelerating glyphosates biodegradation by *Pseudomonas sp* and *E coli* bacteria was done through monitoring the decreasing of glyphosates concentration as time fungtion. Study about glyphosates biodegradation pathway was done through monitoring/identification of biodegradation products by GC instrument, compared with standards.

2. Experimental

The main instrument that used in the project are HPLC (Hitachi, D-7200 in series, detector UV/VIS D-7400) and GC (Shimadzu, QP5050A, Detector FID). Chemicals those are used : glyphosate p.a., acetonitrile p.a., buffer sol., pH 5, phosphate mobile phase for HPLC, *Pseudomonas sp* and *E.Coli* bacteria (produced by biological Lab. Of UPI, those were proven be able to consume glyphosate as phosphourus resource).

Study was initialyzed with mixing 50 g dry soil (bacteria free), 70 mg glyphosate, 1 mL of bacteria (served in agarose liquid) and 60 mL of aquadest. pH of media kept constant at 5 with buffer solution. Sample was dried after mixing and aeration. 10 g of dry sample was

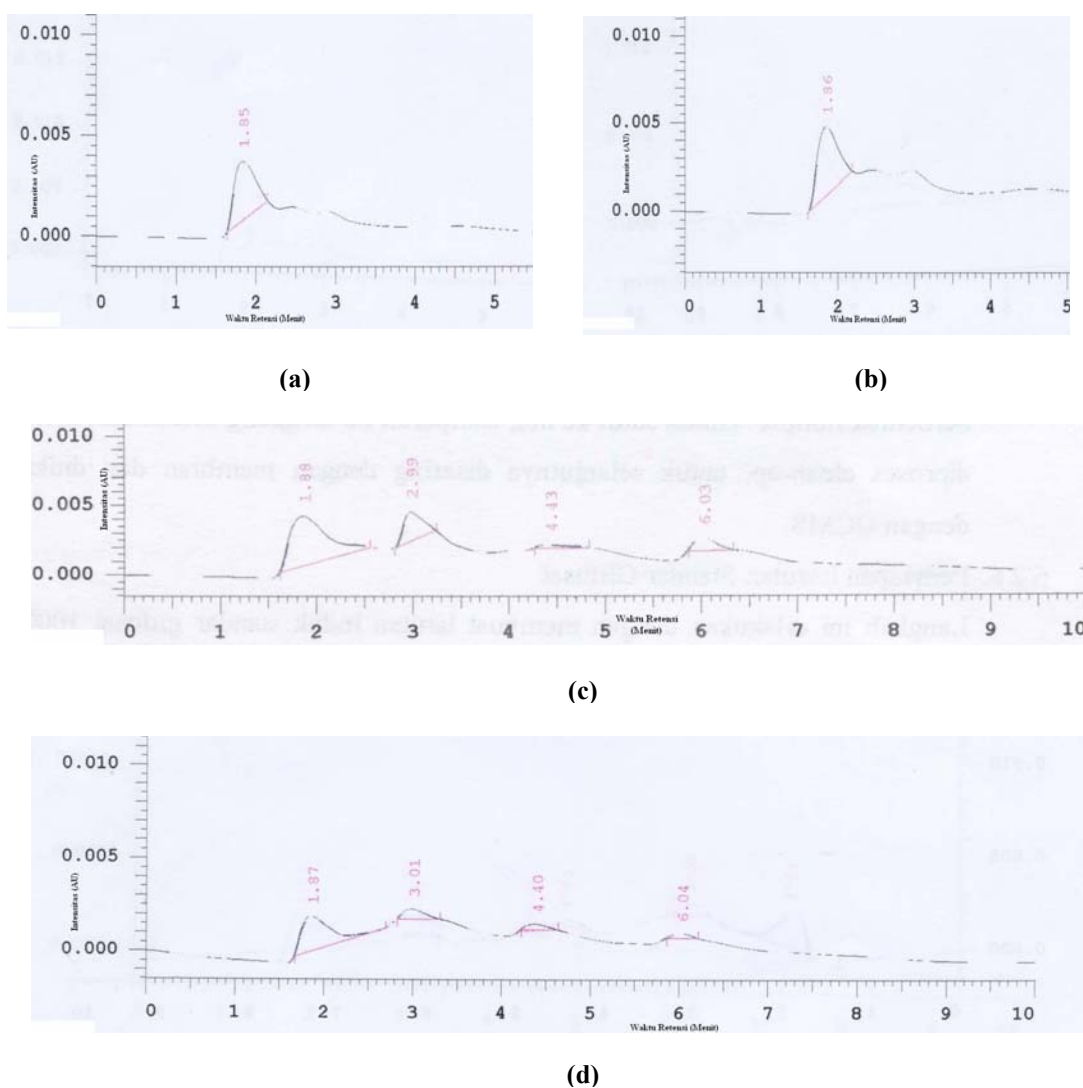
extracted used methanol acetonitrile solvent (1:1). The extractant was then centrifuged at 150 rpm, and the supernatant was evaporated until nearly dry. Before it was measured either by HPLC or GC, the sample was dissolved in mobile phase (for HPLC measurement) and methanol p.a (for GC measurement). Study on acceleration of glyphosate biodegradation was done through monitoring the decreasing of glyphosate concentration as function of biodegradation time. The measurement/identification of GC chromatograms of samples and also standards was done to find out the biodegradation pathway.

3. Result and Discussion

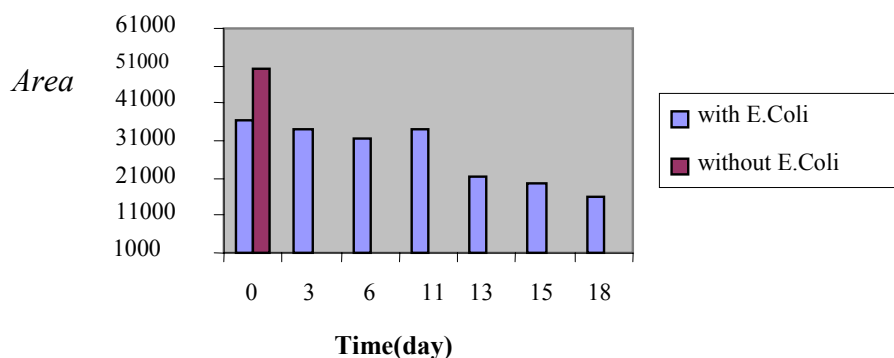
The HPLC chromatograms of glyphosate those were measured after biodegradation process by *Pseudomonas sp* and *E.Coli*, were showed in picture 1.a, 1.b, 1.c, and 2.

The retention time of glyphosate, that was measured at λ 254 nm, flow rate 0, 5 mL/minute, on using octadecylsilane column and phosphate solution as mobile phase is $1, 87 \pm 0, 08$. It's clear, that the decreasing of glyphosate area was showed from time to time, until the 18th day of biodegradation. Picture 3 and 4 showed the decreasing of glyphosate concentration because of biodegradation process.

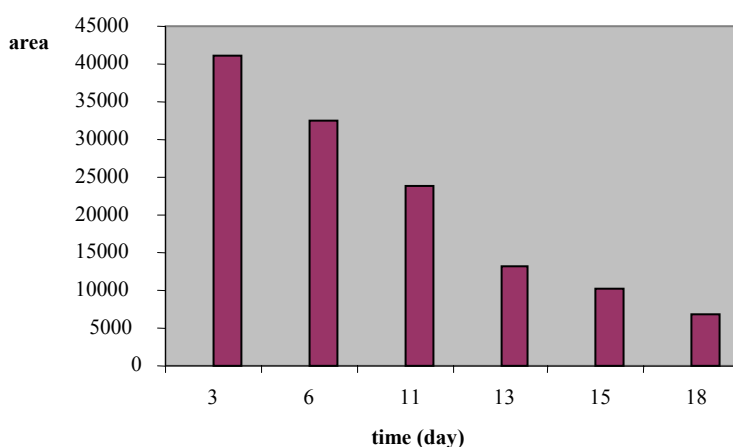
It's also showed that the decreasing of



Picture 1 (a) Chromatogram of 0 day of biodegradation without *E.Co* (b) Chromatogram of 0 day of biodegradation with *E.Coli* bacteria (c) Chromatogram of 9th day biodegradation with *E.Coli* (d) Chromatogram of 18th day biodegradation with *E.Coli*



(a)



(b)

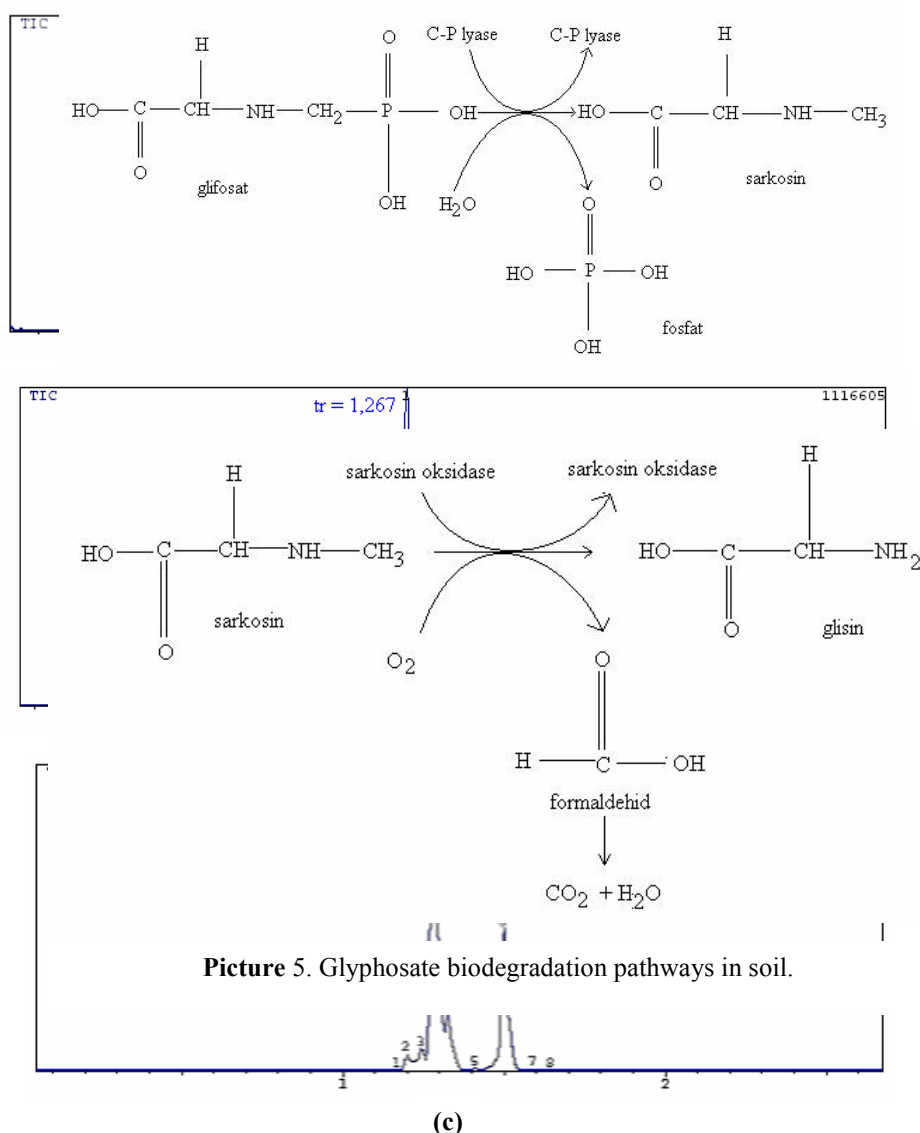
Picture 3 (a). The decreasing of glyphosate concentration by *E.Coli* biodegradation; (b) The decreasing of glyphosate concentration by *pseudomonas sp* biodegradation

glyphosate concentration is followed by the appearance at least 3 new peaks in chromatograms. The retention times of new peaks were quite similar for both of bacteria used. This phenomena indicated that biodegradation processes produced the same substances. The GC chromatograms of biodegradation products strengthened the previous prediction. Picture 4a dan 4b are GC chromatograms of biodegradation product on using *Pseudomonas sp* and *E. Coli* bacteria.

Cox (2002), Petit (1995) and Shimadzu (2001) predicted that glyphosates degradation will occur in two pathways, sarcosine/glycine and AMPA (aminomethylphosphonic acid).

Unfortunately, we have not received AMPA until now, so we only have the two standards, glycine and sarcosine.

Based on they prediction, we measured GC chromatogram of mixture of glycine and sarcosine with the same condition. The retention time of peaks in chromatogram (picture 4c) was very similar with the previous two chromatograms. This convinced us, that glyphosate was degraded through the sarcosine / glycine pathway, both for *Pseudomonas sp* and *E. Coli*. By the result, we predict the illustration of biodegradation pathway as follow:



Picture 5. Glyphosate biodegradation pathways in soil.

Picture 4. (a) Chromatogram of Glyphosate in soil sample of the 18th day of Biodegradation by *Pseudomonas sp* (b) Chromatogram of Glyphosate in soil sample of the 18th day of Biodegradation by *Escherichia Coli* (c) Chromatogram of glycine and sarcosine standards

C-P lyase enzyme in bacteria would be acted as katalist in breaking the C-P bond to produce sarcosine, and moreover was changed into glisine by sarcosine-oxidase enzyme. Meanwhile, the third peak in HPLC chromatograms would be a side product such as formaldehyde or AMPA it self, that couldn't be detected by GC. Some references wrote that bacteria can degrade organic matters through some pathways.

The study about acceleration of glyphosate biodegradation showed a good prospect. Both of bacteria accelerated the glyphosate biodegradation in soil, with the different time

consumed. By assumption, that pesticides biodegradation followed first order of reaction, the half time of biodegradation ($t_{1/2}$) can be measured base on consenstration as time function, on using equations,

$$\ln \frac{[C]_t}{[C]_0} = -kt$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

$[C]_0$ is initially concentration, $[C]_t$ is concentration on t, and k is constant.

Table 2. $t_{1/2}$ of glyphosates degradation, with and without bacteria

Kondisi	K	$t_{1/2}$ (hari)
Tanpa bakteri	-	100 *)
Dengan <i>pseudomonas sp</i>	0,12	5,7
Dengan <i>E. Coli</i>	0,05	14,8

*) source : Cox, 2002

Tabel 2 showed the acceleration of glyphosate biodegradation, with and without bacteria.

Based on data above, we concluded that both of *Pseudomonas sp* and *E. Coli* bacteria could effectively accelerated the rate of glyphosate biodegradation in soil. *Pseudomonas sp* could degraded 17 times faster than naturally biodegradation, and about 3 times faster than *E. Coli*.

4. Conclusion

Glyphosates biodegradation in soil by *Pseudomonas sp* and *E. Coli* have shown high efficiency compare with it naturally biodegradation. Biodegradation of glyphosate by both of bacteria followed sarcosine/glycine pathway and produced the save substances for environment.

5. References

AOAC (Official Methods of Analysis (991.98) (1995), Analysis of Glyphosate and AMPA.

Cox, Caroline (2002), Glyphosate Factsheet, *J. of Pesticides Reform.*, V.108, No.3

Eberbach, Philip L, Lyle A. Douglass (1991), Methods For the Determination of Glyphosate and (Aminomethyl) phosphonic Acid in Soil Using Electron Capture Gas Chromatography, *J. Agric. Food Chemistry*, 39: 1776-1780

Granby, Kit. And Martin Vahl (2001), Investigation of Herbicide Glyphosate and the Plant Growth Regulators Chlormequat and Mepiquat in Cereal Produced in Denmark, *Food Additives and Contaminants*, V.18, No.10

Inskeep, William P., Johnston, and Carl.G.(1999), Effects of Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Contaminant in Soils, *National Centre for Environmental Research*, Montana State University

Jaringan Informasi Kesehatan Terpadu, "Pencemaran pestisida dan pencegahannya", <http://www.infokes.com>, (22 April 2004).

Leung, Sandra, and Tri Pham (2000), Glyphosate Metabolism in Bacteria and Plants, *Herbicides Resistance*, Toronto

Mata Sandoval, Juan, Jefferey Karns, and Alba Torrent (2000), The Influence of Rhamnolipids and Triton x-100 on the Biodegradation of Three Pesticides in Aqueous Phase and Soil Slurry, *ARS National Program*, Dept. of Agriculture, US.

Natawigena, Hidayat (1985), *Pestisida dan Kegunaannya*, Cetakan ke dua, Penerbit CV Armiko, Bandung.

Permanasari, Zackiyah, Fachruraji (2003), Studi Biodegradasi Herbisida Glifosat dalam limbah pabrik menggunakan bakteri *Pseudomonas sp*, Laporan Penelitian dana Mandiri, UPI.

Pettit, Robert E. (1995), Organic Matter, Humus, Humic acid, Fulvic Acid, and Humin: Their Impportance in Soil Fertility and Plant Health, Huma Tech. Inc.

Rabelitso, T.Komang, Erick Senior, Henk W. Van Nerseveld (2002), Microbial Aspects of Attrazine Degradation in Natural Environment, *Biodegradation*, 13: 11-19

Schuette, Jeff (1998), Environmental Fate of Glyphosate, **Environmental Monitoring and Pesticides Management. Dept. of Pesticides Regulation**, Sacramento

Shimazu, Mark, Ashok Mulchandani, Wilfred Chen (2001), Simultaneous Degradation of Organophosphorus Pesticides and Para-nitrophenol by a Genetically Engineered *Moraxella sp* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase, *Biotechnology ang Bioengineering*, Vol. 76, No.4: 318-324

Tarumingkeng Rudy C., (2001), *Pestisida dan Peggunaannya*, UKRIDA Press. 250 p. <http://www.google.com>. (26-09-03).

United State of Environmental Protections Agency (US-EPA) (1992), Food Used Pesticides Classified by US-EPA as Potential Carcinogens, **Northwest Coalition For Alternatives to Pesticides**.

White, Graham F.(1995), Multiple Interactions in Riverine Biofilms-Surfactant adsorption, Bacterial Attachment and Biodegradation, *Water Science and Technology*, Vol. 31.No.1: 61-70.

.....(2003), Pesticides and Groundwater Contamination, *The Ohio State University Bulletin*, 820. Ohio.

Pemekatan Emas(I) Sianida Dengan Metode Ekstraksi Kembali (*Stripping*)

Ani Mulyasuryani¹⁾ dan Novi Christina²⁾

1) Jurusan Kimia FMIPA Unibraw
Jl. Veteran Malan, 65145, Indonesia
e-mail : mulyasuryani@yahoo.com.

2) Jurusan Kimia FMIPA Unibraw
Jl. Veteran Malan, 65145, Indonesia

Abstrak

Pemekatan dan pemurnian emas hasil pelarutan dengan sianida dapat dilakukan dengan metode stripping, yaitu emas(I) sianida dalam fasa air diekstraksi ke dalam fasa organik menggunakan $[C_{16}H_{33}(CH_3)_3N]Br$ (cetyltrimethylammonium bromide) sebagai pereaksi. Dalam fasa organik emas(I) sebagai kompleks pasangan ion $[C_{16}H_{33}(CH_3)_3N]^+ [Au(CN)_2]^-$. Stripping dilakukan dengan menambahkan fasa air baru ke dalam fasa organik yang telah mengandung kompleks pasangan ion di atas. Pada penelitian ini, dipelajari pengaruh pH, dan pengaruh konsentrasi ion SCN dalam fasa air. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi emas(I) hasil stripping dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi SCN. Kondisi optimum dicapai pada pH=8 dan konsentrasi SCN = 4 mM. Pada kondisi tersebut konsentrasi emas hasil ekstraksi sebesar 209 ppm dari konsentrasi emas awal sebesar 49 ppm.

Kata kunci : emas(I) sianida ; stripping ; cetyltrimethylammonium bromide

1. Pendahuluan

Mineral emas terdistribusi secara luas di alam, namun umumnya terdapat dalam jumlah sedikit untuk dapat diekstraksi. Penambangan emas baru dianggap menguntungkan bila kadar emas dalam mineral lebih besar dari 10 ppm. Perkembangan teknologi saat ini memungkinkan penambangan emas dengan kadar 2 ppm telah cukup menguntungkan untuk dilakukan. Untuk meningkatkan kemurnian dan kadar emas hasil pertambangan dapat dilakukan dengan metoda pemisahan, baik secara adsorpsi maupun ekstraksi (McDougall, at.al).

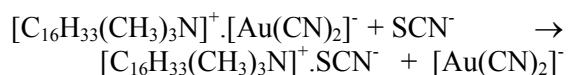
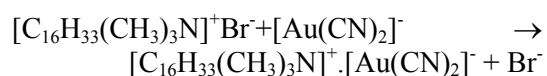
Emas di alam terdapat dalam keadaan bebas atau dalam bentuk senyawanya, misalnya *calaverite* ($AuTe_2$), *Sylvanite* ($AuAgTe_2$), *Kalgoorlite* ($AgAuHg_2Te$), dan *petzite* ($(AuAg)_2Te$) (Sneed, 1954). Selain sebagai mineral utama, emas dapat juga dijumpai sebagai logam ikutan dalam bijih tembaga dan timah hitam. Metode pelarutan emas yang digunakan sampai sekarang adalah melalui

pelindihan dengan menggunakan sianida sebagai ligan yang menghasilkan ion kompleks $[Au(CN)_2]^-$. Emas tersebut dapat dipisahkan sebagai logam bebas dengan penambahan bubuk Zn (Lee,1991 ; Klein and Hurbult, 1985).

Metode pemisahan dan pemekatan emas dalam bentuk kompleks $[Au(CN)_2]^-$ sudah banyak dilakukan diantaranya adalah pemekatan $[Au(CN)_2]^-$ menggunakan karbon aktif (Solichah, 2003). Pada penelitian tersebut, $[Au(CN)_2]^-$ dalam suasana asam dapat membentuk $HAu(CN)_2$ sehingga dapat diadorpsi dengan karbon aktif. Desorpsi dilakukan pada pH basa dengan menambahkan amonium hidroksida. Tingkat pemekatan yang dihasilkan sebesar 2 kali. Pemisahan dan pemekatan telah pula dilakukan dengan cara mengekstraksi $[Au(CN)_2]^-$ yang direaksikan terlebih dahulu dengan menggunakan pereaksi CTAB (*Cetylmethylammonium Bromida*). Pada metoda tersebut efisiensi ekstraksi mencapai

97,73 % (Mulyasuryani, 2003), akan tetapi pada kondisi yang sama, perak dan tembaga yang terlarut sebagai $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$, dan $[\text{Cu}(\text{CN})_2]^-$ ikut terekstraksi masing-masing sebanyak 60,99 % dan 81,59 % (Mulyasuryani, 2004). Untuk mengatasi masalah tersebut dilakukan ekstraksi kembali emas(I) dari fasa organik ke dalam fasa air baru.

Ekstraksi kembali emas yang merupakan hasil ekstraksi $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ yang direaksikan dengan CTAB, dapat dilakukan menambahkan ion tiosianat ke dalam fasa air baru. Reaksi yang terjadi adalah (Rohm and Haas, 2004):



Pada penelitian ini telah dilakukan pemekatan $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ secara ekstraksi kembali atau *stripping*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan logam emas yang dilarutkan dalam larutan KCN 0,5 M. Ekstraksi pertama dilakukan pada pH = 4 dengan konsentrasi CTAB 0,4 mM dalam 100 mL larutan sampel, dan fasa organik yang digunakan adalah kloroform sebanyak 10 mL. Pada ekstraksi kembali dipelajari pengaruh pH dan konsentrasi SCN^- , sedangkan fasa air yang digunakan sebanyak 10 mL. Untuk mengetahui kadar emas yang terekstraksi kembali dilakukan analisis secara spektrofotometri serapan atom.

2. Percobaan

2.1. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Logam emas, asam asetat (CH_3COOH) 100 % (bj = 1,05 kg/L), asam ortofosfat (H_3PO_4) 85 % (bj = 1,71 kg/L), asam borat (H_3BO_3), CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*), KCN, KSCN, NaOH, dan kloroform. Peralatan yang digunakan meliputi SSA merek Philips PU 9100X, pH-meter merek orion 420A dan shaker merek Edmund Bühler SM25.

2.2. Ekstraksi $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ Menggunakan Pereaksi CTAB

Larutan $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ 49 ppm dalam larutan buffer pH = 4 sebanyak 100 mL ditambah dengan larutan CTAB dengan konsentrasi akhir 0,4 mM. Ke dalam campuran tersebut ditambah

dengan 10 mL kloroform dan dilakukan pengocokan selama 15 menit dengan kecepatan 225 rpm. Campuran dipindahkan ke dalam corong pisah dan fasa organik dipisahkan.

2.3. Pengaruh pH Ekstraksi Kembali terhadap Efisiensi Ekstraksi Kembali Emas(I)

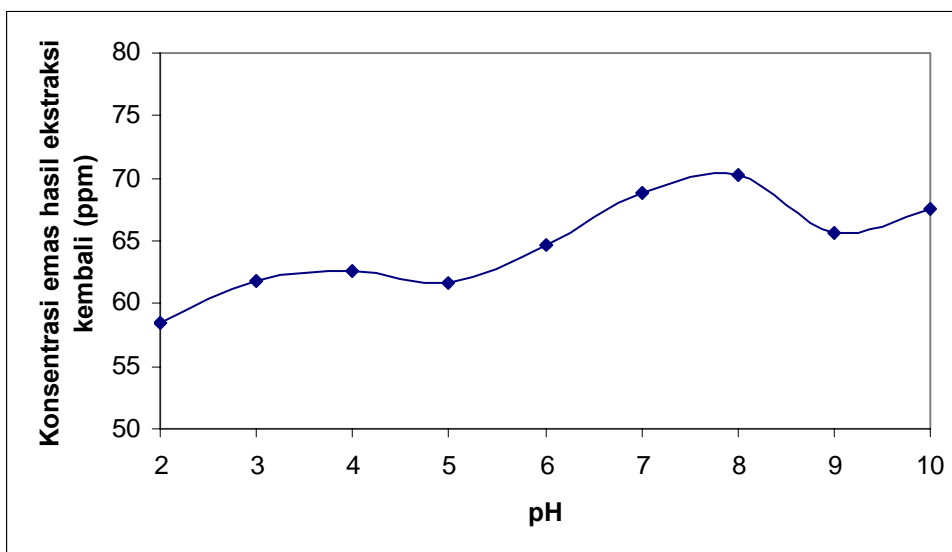
Fasa organik dari hasil ekstraksi di atas ditambah 10 mL larutan SCN^- dalam buffer, kemudian dilakukan pengocokan selama 15 menit dengan kecepatan 225 rpm. Campuran dipindahkan ke dalam corong pisah dan fasa organik dipisahkan. Fasa air hasil ekstraksi kembali diukur dengan SSA.

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Pengaruh pH terhadap Konsentrasi Emas(I) Hasil Ekstraksi Kembali

Ekstraksi kembali dilakukan untuk mendistribusikan ion emas yang sudah berada di dalam fasa organik ke dalam fasa air baru dengan pengaturan pH dan penambahan ion tiosianat. Untuk memperoleh efisiensi ekstraksi kembali yang maksimal maka perlu diupayakan agar kompleks pasangan ion di dalam fasa organik terurai. Penguraian kompleks pasangan ion itu dapat terjadi jika ion $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ digantikan oleh ion tiosianat. Ion $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ yang terdistribusi ke dalam fasa air baru dapat mengurai menjadi ion Au^+ dan CN^- dalam kesetimbangan. Ion $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ dalam fasa air dapat membentuk $\text{HAu}(\text{CN})_2$, sehingga jumlah H^+ dalam fasa air akan mempengaruhi jumlah $\text{HAu}(\text{CN})_2$. Molekul $\text{HAu}(\text{CN})_2$ merupakan spesi netral sehingga lebih mudah terdistribusi ke dalam fasa organik.

Hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 1 memperlihatkan bahwa pada kisaran pH 2 hingga 8, konsentrasi emas yang dihasilkan meningkat dari 58 menjadi 70 ppm, dari konsentrasi awal 50 ppm. Sedangkan pada pH di atas 8 terjadi sedikit penurunan konsentrasi emas yang dihasilkan. Pada pH asam diperkirakan konsentrasi H^+ yang ada dalam fasa air masih cukup untuk mengikat ion $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ menjadi $\text{HAu}(\text{CN})_2$ yang kemudian terdistribusi ke dalam fasa organik. Sedangkan pada pH di atas 8 adanya ion OH^- sebanyak 10^{-5} M dapat menghalangi pergantian $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ dalam kompleks pasangan ion oleh ion SCN^- . Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa pH optimum ekstraksi kembali emas(I) adalah 8.



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali.

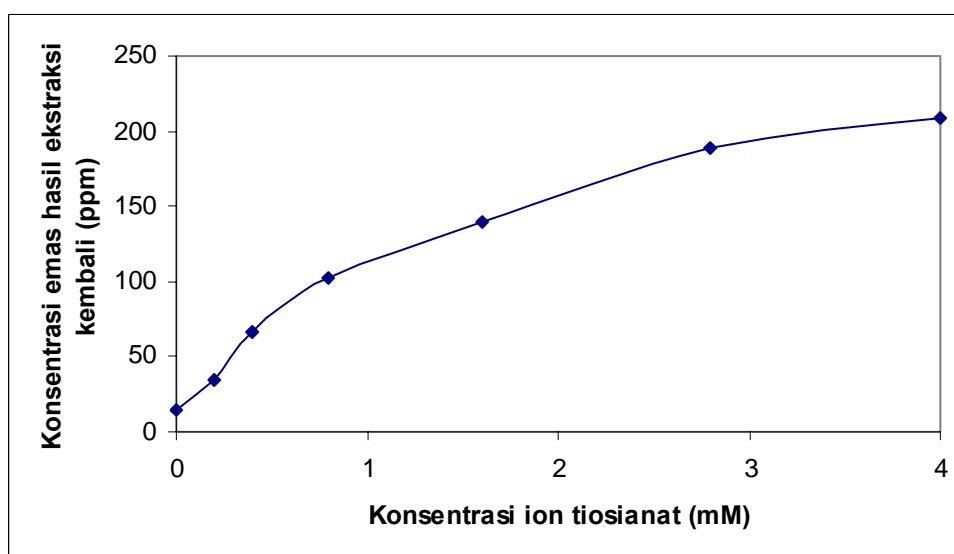
3.2. Pengaruh Konsentrasi Ion Tiosianat Konsentrasi Emas(I) Hasil Ekstraksi Kembali

Pada penelitian ini diamati perubahan konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali pada konsentrasi tiosianat 0 hingga 40 mM, untuk konsentrasi CTAB 0,4 mM dan konsentrasi emas(I) awal 49 ppm. Hasil penelitian pengaruh konsentrasi ion tiosianat disajikan pada Gambar 2. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi ion tiosianat dapat meningkatkan konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali. Konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali diperoleh pada konsentrasi ion SCN^- sebesar 4 mM. Pada

kondisi tersebut, konsentrasi emas yang dihasilkan mencapai 209 ppm. Semakin besar konsentrasi ion SCN^- akan memperbesar jumlah $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ yang tergantung pada kompleks pasangan ion $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{N}]^+ \cdot [\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ menjadi $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{N}]^+ \cdot \text{SCN}^-$. Semakin banyak $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ tergantung atau lepas maka semakin banyak emas(I) yang terdistribusi ke dalam fasa air. Perbandingan mol CTAB : SCN^- pada kondisi ini adalah 1: 1.

3.3. Pengujian Tingkat Pemekatan

Untuk menguji tingkat pemekatan emas(I) hasil ekstraksi kembali dilakukan pada berbagai konsentrasi emas(I). Penujian dilakukan pada



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi ion tiosianat terhadap konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali.

Tabel I. Konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali pada konsentrasi emas awal yang berbeda.

[emas(I)] awal (ppm)	[emas(I)] hasil <i>stripping</i> (ppm)		
	1	2	rata-rata
10	19	17	18
19	34	35	34
28	44	46	45

pH = 8 dan konsentrasi SCN⁻ sebesar 4 mM. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel I berikut :

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa dengan menggunakan konsentrasi emas awal dapat menurunkan konsentrasi emas(I) yang dihasilkan dengan tingkat pemekatan yang lebih rendah yaitu kurang dari 2 kali. Dengan menggunakan konsentrasi emas awal 49 ppm, tingkat pemekatan lebih dari 4 kali, pada kondisi ini, perbandingan mol CTAB dengan Au(I) sebesar 5 : 8. Pada konsentrasi emas awal kurang dari 49 ppm akan terjadi kelebihan CTAB yang akan terdistribusi ke dalam fasa organik. Hal tersebut dapat merupakan salah satu sebab menurunnya tingkat pemekatan. Ion SCN⁻ tidak hanya dapat menggantikan [Au(CN)₂]⁻ dari kompleks pasangan ion [C₁₆H₃₃(CH₃)₃N]⁺. [Au(CN)₂]⁻ tetapi juga dapat menggantikan Br⁻ dari CTAB. Oleh karena itu, untuk memperoleh tingkat pemekatan yang baik perlu memperhatikan jumlah CTAB yang ditambahkan pada ekstraksi pertama.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa keberhasilan ekstraksi kembali emas(I) dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi ion tiosianat. Kondisi optimum ekstraksi kembali emas(I) dicapai pada pH 8 dengan konsentrasi tiosianat 4 mM untuk konsentrasi emas(I) awal 49 ppm. Konsentrasi emas(I) hasil ekstraksi kembali pada kondisi optimum mencapai 209 ppm, dengan tingkat pemekatan 4 kali. Penurunan konsentrasi emas awal dapat menurunkan tingkat pemekatan, maka perlu memperhitungkan kembali konsentrasi CTAB yang ditambahkan pada saat ekstraksi pertama.

5. Ucapan terima kasih

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang telah memberi kesempatan dalam penelitian yang didanai DPP/SPP sebagai studi awal penelitian ekstraksi Emas(I) Sianida dengan menggunakan CTAB.

Jurusan Kimia FMIPA Unibraw yang telah memberi kesempatan dalam Penelitian Kompetitif (Research Grant) melalui Proyek Semi-Q.

6. Daftar Pustaka

- Lee, J.D. (1991) **Concise Inorganic Chemistry**, 4th ed., Chapman and Hall Company, London, hal 819-824
- Klein, C. dan C. S. Hurbult. 1985. **Manual of Mineralogy**. 20th ed. John Wiley & Sons. Inc. New York. hal 257-258.
- McDougall, G.J., R.D. Hancock, M.J. Nocol, O.L. Wellington, R.G. Copperthwaite, *The Mechanism of The Adsorption of Gold Cyanide on Activated Carbon*, pdf, **80**, 344
- Mulyasuryani, A. (2003). *Ekstraksi Emas(I) Sianida Menggunakan Pereaksi CTAB*, Laporan Penelitian DPP/SPP, FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.
- Mulyasuryani, A. (2004). *Ekstraksi Peraks(I) dan Tembaga(I) Sianida Menggunakan Pereaksi CTAB*, Laporan Penelitian Research Grant Semi-Q, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.
- Rohm and Haas. (2004). *Gold Recovery from Cyanide Liquors*, <http://www.rohmhaas.com/ionexchange/IP/goldrecovery.htm>.
- Schlumberger. (2003). *Diagram of Quaternary Amine*, Schlumberger Limited. <http://www.glosary.oilfield.slb.com/DisplayImage>.
- Sholichah, T. (2003) *Pemekatan Emas Sebagai Ion Kompleks [Au(CN)₂]⁻ Menggunakan Karbon Aktif Sebagai Adsorben*, Skripsi, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.

The Plant Growth Regulator Spray on Fruits: Dilemma Persists?

Arba'at Hassan & Maimunah Sokro

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi Selangor
email: arbaat@yahoo.com and mysukro@pkriscc.ukm.my

Abstract

The sophisticated developments in bio-technology and food industries have made seasonal fruits available all times. Fruits exported from temperate countries (e.g.: apples and grapes), can be available at tropical and all places, as if they were grown from local areas, all year round. What make these fruits fresh, as if they were just plucked from trees, had raised questions among Americans even though they were concerned about their health. The dilemma of plant growth regulator, Alar (other names: Butanedioic amino acid mono; succinic acid; 2,2 dimethylhydrazide; UDMH=unsymmetrical dimethylhydrazine), spray to delay in ripening fruits, attain better colour, and a firmer texture (particularly on apples), exploded in 1989. This major environmental and health risk issues created a furor among Americans considered a national disaster. The concern on the consuming Alar-laden apples, believed to be the most potent cancer causing substance (carcinogenic), got out of control. School lunchrooms and school districts in the USA removed apples from their menus. Parents threw apple products for their children and family down sink drains. Stores pulled apples from their shelves. Apples sales plummeted. Apple industries (e.g.: Gerber, Heinz, and Beech Nut) stopped using Alar-treated apples in baby foods, Safeway, Kroger, Grand Union, and Giant grocery chains stopped stocking apples treated with Alar. Apple growers suffered losses at hundred of millions of dollars. There had been less news coverage of the fact that studies after studies had since found that Alar was neither an environmental health problem nor a cause a panic. To present, there was no mainstream, peer-reviewed research suggested that trace exposures to Alar, of the sort consumers could expect from eating apples or drinking apple juice, had caused cancer. After years, however, the fallout from this man-made panic is still around. Apple growers had never recovered the money they lost. Public remains wary of man-made chemicals, which ironically, had generated the higher crop yields that helped feed the world. This issue has also distracted Americans from genuine risks of cancer and the plant growth regulator (Alar) spray on apples...still lingers as a nightmare...

Keywords: Alar, plant growth regulator, succinic acid, UDMH, carcinogen

1. Introduction

Many kinds of fruits, particularly apples, have been treated with chemical, daminozide, a plant growth regulator (also known with trade names Alar, Kylar, and B-nine), since 1968. It is manufactured by the Uniroyal Chemical Co., Connecticut, USA, under pesticide group. A major environmental and health risk issue, the spraying of Alar on apples, created a furor among Americans in early 1989. After hearing charges, the Natural Resources Defense Council viewed that consuming Alar-laden apples, believed to be the most potent cancer

(carcinogenic). The panic quickly got out of control. School lunchrooms and school district authorities removed apples and its products. Parents poured apple juice, apple sauces, and other apple products for their children and family down sink drains. Stores pulled out apples from shelves. People stopped buying and consuming apples. Apple industries (like Gerber, Heinz, and Beech Nut) stopped using Alar-treated apples in food products. Safeway, Kroger, Grand Union, and Giant grocery chains discontinued stocking apples treated with Alar!

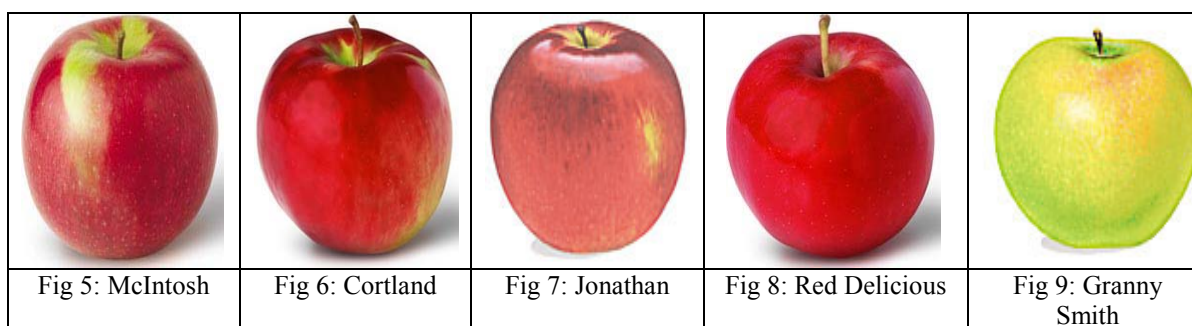
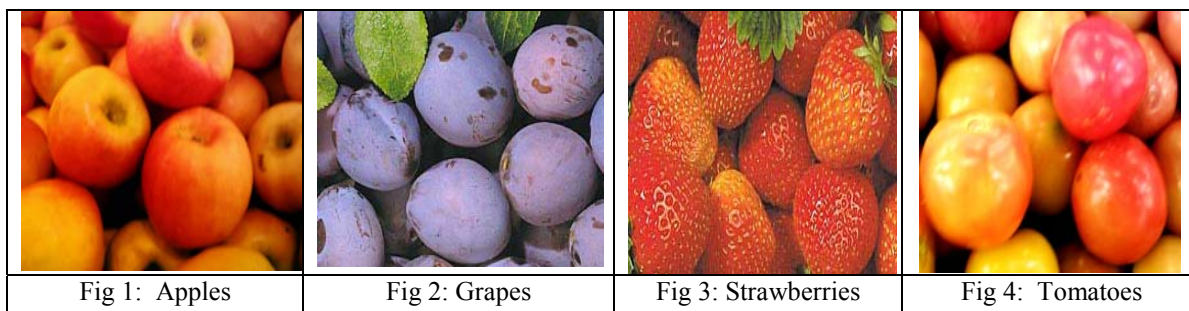
Apples sales plummeted.

Studies on fruits (especially apples) treated with Alar were reviewed. Articles, newspapers, printed media, provided apple industries a prominent voice. Ten years later, however, the fallout of this man-made panic was still lingers. Apple growers suffered loses estimated at hundred of millions of dollars. They have never recovered the money they lost. The public remains wary of man-made chemicals, which ironically, have generated the higher crop yields that help feed the world. This dilemma also distracted Americans from genuine risks of cancer.

The Properties

The plant growth regulator, daminozide, a white crystalline material of low volatility, slight odor, is soluble in mixed solvents (at

25°C: water 57%; methanol 29%; acetone 14%). In practical, it is insoluble in aromatic and aliphatic hydrocarbon solvents (JMPR, 1977). The technical grade product from the primary producer is typically >99% daminozide. The manufacturing specifications require 98% minimum and a melting point range of 154°C to 161°C. This white powder may contain traces of moisture, succinic acid, succinic anhydride and a salt of daminozide and unsymmetrical dimethyl-hydrazine (UDMH). Volatile impurities are removed by an oven drying step in the process. Daminozide was formerly manufactured by a process in which dimethylnitrosamine was a starting reactant. The primary manufacturer, Uniroyal, is now changing to a new process in which dimethylnitrosamine is not used. Daminozide is now commercially available only in



formulations of water-soluble powders (containing 85% active ingredient and 15% inert surfactants and mineral salts). Shelf-life studies show no degradation of the formulations over a period of years. Liquid formulations formerly produced are no longer commercially available (JMPR, 1977).

Alar plant growth regulator common name, daminozide, has several other chemical names, like N-dimethylaminosuccinamic acid, succinic acid 2,2-dimethylhydrazide, and butanedioic acid mono (2,2-dimethylhydrazide). It also bears trade names like Kylar, SADH, B-nine, B-995, and Aminocide (JMPR, 1977). In everyday life, Alar, known as a plant growth regulator, used to delay ripening on fruits, attain better color (by making apples a deeper red and a firmer texture on fruits), and gives apple growers a better chance of yielding a uniform crop with less effort (Environmental Research Foundation, 1989; Levendosky, 1998; GNU FDI, 2003). There are several disadvantages for using Alar. It is soluble in mixed solvents and is absorbed through leaves, roots, and stems. Later, it is translocated in plants and accumulated in roots, fruits, and elsewhere. In the case of apples, it penetrates the pulp and cannot be washed, cooked or peeled off. Technically, daminozide contains at least 95% active ingredients with tolerance level in agriculture of 30 parts per million (ppm) to 20 ppm. The Environmental Protection Agency (EPA) officials declared that Alar is used majority on red apples (McIntosh, Cortland, Staymen, Jonathan, and Red Delicious) and not on green apples (Granny Smith variety), although it is used on Golden Delicious apples (Shabecoff, 1989).

The Applications

Since 1968, many types of fruits, particularly some varieties of red apples, have been sprayed with Alar. This chemical, daminozide [trade names: Alar, Kylar, and B-nine], is manufactured by the Uniroyal Chemical Co., Naugatuck, Connecticut, USA.

This paper discusses the issue of plant growth regulator (Alar) spray on fruits (apples) in the USA. It is used primarily on apples, grapes, strawberries, and tomatoes (Figs 1, 2, 3, and 4) to delay in ripening fruits, attain better colour by making apples a deeper red and a firmer texture, and giving apple growers a better chance of yielding a uniform crop with less

effort (Environmental Research Foundation, 1989; Levendosky, 1998; GNU FDI, 2003). The spraying of Alar prevents premature dropping will enable the entire orchard be harvested just once instead of periodically over six weeks. For marketers, Alar offers more uniformly shapes and coloured fruits, and can extend the usual six- to eight-month shelf life of apples to approximately one year (Hawley, 1981; Raloff, 1985). The problem is, Alar penetrates the pulp and cannot be washed, cooked or peeled off (Begley & Hager, 1989).

The Dilemma

The officials of the United States of America Environmental Protection Agency (EPA) said that Alar is applied on red apples, McIntosh (Fig 5), Cortland (Fig 6), Jonathan (Fig 7), and Red Delicious (Fig 8), and not on green apples like the Granny Smith variety (Fig 9), although is used on Golden Delicious apples (Arbaat & Maimunah, 2004; Shabecoff, 1989). Couple tests showed that Alar broke down into UDMH=unsymmetrical dimethylhydrazine or 1,1-dimethyl-hydrazine, which might be carcinogenic. A carcinogen is a cancer causing substance. The tests proved that the primary break down product [of Alar] UDMH causes several different kinds of cancer in mice and rats.

The Alar scare issue exploded in 1989. *The New York Time's* personal Columnist published a report by the American Council on Science and Health about an "updated and expanded" edition of "Facts and Fears." The columnist, Jane E. Brody, reminding readers that daminozide sprayed on apples was the "greatest health scares of the last five decades." Following that, the *CBS 60 Minutes* broadcasted the story through Meryl Streep, an actress, testified before Congress and on TV talk shows more about the dangers of Alar. To make the issue an extra ordinary, The Natural Resources Defense Council (NRDC) manipulated the report of "*Intolerance Risk: Pesticides in Our Children's Food*" addressed to about 40 million audiences around the USA that Alar was dangerous and could cause cancer (Negin, 1989).

The subsequent tests by the National Cancer Research Institute (NCRI) and Environmental Protection Agency (EPA) in the Brody's column and TV talk shows failed to show that Alar caused cancer. However, the dilemma and

scare spread throughout the country very fast. The public panicked, parents poured apple juice, apple sauces, apple custard, and other apple products down sink drains. School systems quickly scrapped apples from their menus, supermarkets took them off their shelves, and public stopped buying apples. As consequences, apples sales plummeted. Apple orchard owners and industries lost their businesses around \$375 millions. This amount has never been recovered (Negin, 1999). The broadcast and ban were not the end of the story. Apple growers in Washington State filed a libel suit against CBS, NRDC and Fenton Communications, claiming the "scare" had cost them \$100M. The suit was dismissed in 1994. Meanwhile, Elizabeth Whelan and her organization, the American Council on Science and Health (ACSH), were working to establish a narrative of the episode as a "scare". The ACSH claimed that Alar and its breakdown product UMDH had not been shown to be carcinogenic, even going so far as to claim that the National Cancer Institute had cleared Alar as a carcinogen. Whelan's campaign was so effective that today, "Alar scare" is shorthand among news media and food industry professionals for an irrational, emotional public scare based on propaganda rather than facts (Arbaat & Maimunah, 2004).

While this growth regulator has been verified as a human carcinogen, the amount necessary for it to be dangerous may well be absurdly high. While the lab tests that prompted the scare required an amount of Alar equal to over 5000 gallons (20,000 L) of apple juice per day, Consumers Union ran its own studies and estimated the human lifetime cancer risk to be between 5 to 50 per million (1 case per million is the threshold at which the government considers a carcinogen a significant public health concern). Needless to say, there is a lot of room for debate on the issue (as there is with any politicized issue). The so-called Alar scare dilemma occurred more than 10 years but is still very much in the news. The affair also becomes a favourite media symbol for a false alarm. Lets us find out into points of several toxicological tests, to find supports whether the chemical of Alar posed dangers or not, conducted by several individuals and agencies (Arbaat & Maimunah, 2004).

Studies Related to Alar

Developed in the 1960s, Alar was a means of slowing the growth of plants. Its active ingredient, daminozide, is a manmade, hormonlike chemical. It's utility lay largely in its conduciveness to the maturation of red apples and cherries. It underwent two years of carcinogenicity testing on rats before the US Food and Drugs Administration (FDA) make it legal for market. Dr Bernard Oser had conducted carcinogenicity tests of Alar on rats and mice for the FDA as early in 1966. After two years of high-dose feeding, no tumors were found in any of the 32 tissues examined. The manufacturer, Uniroyal Corp., was given the license to sell Alar in 1968. Alar can hold apples longer on the tree, so growers have more picking time before the fruit drops, and the apples have more time to develop red bright deep color. These are the economic and cosmetic advantages (Wargo, 1996).

Couple toxicological tests in 1970 showed that Alar broke down into UDMH=unsymmetrical dimethylhydrazine or 1,1-dimethylhydrazine, which might be carcinogenic, a cancer causing substance. By 1973, there were some highly controversial and purely hypothetical risks associated with Alar. Dr Bela Toth, of Eppley Institute for Research in Cancer of the Omaha, Nebraska, conducted several experiments, found that at several times the (1) "maximum tolerated dose (MTD)" for males (i.e., in quantities that might render an intrinsically uninjurious substance harmful), a breakdown product of Alar—1,1-unsymmetrical dimethylhydrazine (UDMH), had caused tumors in blood vessels, livers, kidneys, and lungs of mice, and (2) at several times the MTD, Alar itself had been responsible for a higher tumor incidence in mice (Smith & Raso, 1999). This finding was of interest of the federal regulators because Alar contains about 50 parts per million (ppm) UDMH, mammals convert about one percent of Alar to UDMH, and about five percent of the Alar residue on apples converts to UDMH during processing of apple juice and applesauce. This proof was supported in subsequent study by other evidence completed in 1977 when Dr Toth found high tumor in mice fed Alar (Rosen, 1990).

A study conducted in 1973 served as the toxicological basis for the EPA's concern over

Alar. The experiment conducted by the NCRI supplied UDMH drinking water on rats. Two male and two female rats were treated with a single oral dose of approximately 5 mg/kg unlabelled daminozide and 96 hours later with a single 5 mg/kg oral dose of ¹⁴C-labelled daminozide (position of ¹⁴C label unspecified) to study the absorption and excretion of daminozide. After 2 days, 69% of the administered dose had been excreted in the faeces, 24% in the urine, and 2.4% expired as ¹⁴CO₂. Daminozide is rapidly excreted and did not bioaccumulate in rats. Rats sacrificed 2 days after dosing contained an average of 0.35% of the administered dose in the brain, liver, lung, heart and spleen with the majority of this residue in the liver. The rats sacrificed 4 days after dosing contained only 0.03 or 0.12% of the administered dose in these organs (Ryer, 1966). This was disturbing news because Alar can degrade into UDMH in the human stomach when it is heated, for example, in the process of making applesauce and apple juice.

More studies in 1978 and 1979 proved UDMH to be a potent carcinogen in mice, rats, and hamsters. In 1978 the NCRI published results of a carcinogen bioassay of daminozide and concluded that it was a weak carcinogen. Bioassay is a test of a substance activity in organisms (mice, for example). However, daminozide's carcinogenicity measurement was so trivial that the EPA could not use the NCI data for quantitative assessment. The manufacturer of Alar, Uniroyal, took further action by sponsoring several other daminozide's carcinogenic bioassay tests to find more supporting evidences (Smith & Raso, 1999, p. 2).

According to Levendosky (1984) Alar might cause cancer! He added his statement: "Yes, in mice! However, if a person is given the equivalent of 28,000 pounds of apples treated with Alar...everyday....for the duration of 70 years, the possibility that he or she gets cancer is high. However, this fact was not publicized...if you got full after eating 14,000 pounds of apples a day, there was no measurable effect with the amount. The bottom line is "Alar is harmful to people" (p. 5-6). In 1984, the U.S. government's National Toxicology Program categorized UDMH as a "probable human carcinogen" (Montague, 1997).

More and more studies were conducted in 1985. The EPA's Head of Special Review Branch officer, Paul Lapsley, received data from Uniroyal related to the residue of crops and dairy animals for meat. The information showed that daminozide was present "at significant levels." The evidence was also demonstrated that daminozide "converted into UDMH in human body." Thus, UDMH was probably 1,000 times more carcinogenic than the parent compound Alar and washing apples treated with Alar did not remove either these contaminants (Raloff, 1985).

The EPA stated that lifetime exposure to the chemical Alar could cause cancer in a large population of human beings. Based upon this and previously studies, the EPA in September 1985 planned to ban Alar (carcinogen daminozide) (Raloff, 1985). Again, during March 1989, the EPA repeatedly said that they planned to ban Alar within eighteen months. The reason being that was UDMH (the break down product of Alar) is the chemical cousin of rocket fuel which forms through heat processing into sauce or juice. This may also be found in traces of Alar itself which is often sprayed in apple orchards. Furthermore, the EPA believed that UDMH in apple products would probably cause cancer of 45 in one million over a lifetime (Begley & Hager, 1989; Smith & Raso, 1999).

The National Food Processors Association (NFPA) announced in 1986 that Alar or UDMH had been found in 73 samples of applesauce and 132 apple juice. Gerber even found Alar in its baby food products. By law, the EPA should have banned Alar because cancer causing agents were not permitted in processed food. However, even several evidences were found, EPA still legalized Alar to be on the market. EPA finally decided not to ban Alar but to cut by 50 percent the amount that could legally be contained in apples. That was the eight recommendation of a member EPA scientific committee; seven were who paid consultants to the chemical industry. Others came to their own decisions. The larger producers of baby foods (Heinz, Beech Nut, and Heinz) stopped using Alar-treated apple in their baby foods. The grocery chains (Safeway, Kroger, Grand Union, and Giant) announced that they would not stock apples treated with Alar. The urge to ban Alar also came from the

American Academy of Pediatrics. Several states, like Maine and Massachusetts, restricted Alar use immediately. Citizen groups, states, and pediatricians were suing EPA to enforce the law and ban of Alar. The NRDC released findings in press conference and a book stating that children received higher exposures to chemicals in foods than adults. This is because they consume more fruits, particularly apples, applesauce and apple juice, and vegetables. They are also more sensitive to many toxins, than are adults. The NRDC study discussed not just for Alar, but 23 other chemicals, mostly pesticides in fruits and vegetables (Wargo, 1996).

The acting EPA Administrator was commenting on the preliminary results of Uniroyal's own study of Alar in 1989, stated that "There is an inescapable and direct correlation between exposure to UDMH and the development of life-threatening tumors in mice." The EPA calculated and believed that UDMH in apple products would cause cancer of 45 in one million over a lifetime. The EPA announced the beginning of a process that would result in the ban of Alar, but before it could take effect, the manufacturer pulled it from the market and its registration, or license for use, soon expired. In 1991 and 1992, EPA reconfirmed its decision that Alar posed an unacceptable risk as a probable human carcinogen. The NCI never issued a report clearing Alar as a carcinogen, a serious cancer risk.

Under the circumstances, it's not surprising that a number of health experts have personally stepped forward to criticize the Alar scare.

- In a February 1992 press conference, Dr. C. Everett Koop stated that "As a pediatric surgeon, as well as the national former Surgeon General, I care deeply about the health of children, and if Alar ever posed a health hazard, I would have said so then would say so now. When used in the regulated, approved manner as Alar was before it was withdrawn in 1989, Alar-treated apple products posed no hazard to the health of children or adults" (Smith, 1998).
- Dr. Richard Adamson of the National Cancer Institute informed *The Washington Times* in March 1992 interview stated that

the risk of eating apple with trace amounts of Alar is "certainly less than the risk of eating a well-done hamburger" and about the same risk as eating peanut butter sandwich" (Smith, 1998)..

- Additionally, in June 1993 *ECO Journal* issue, Dr. Michael Gough, a molecular biologist and risk-assessment specialist at the Congressional Office of Technology Assessment said that the NRDC ignore the highest proven risks to health, like smoking and fat in diet, and focus their energies on risks that are tiny in comparison. It is designed to attract donations, not to improve public health" (Smith, 1998).

The debate on the Alar dilemma has been going on and on. Pesticide residue, like Alar, in food and drinking water has also become a "hot button" issue for millions of parents and consumers. The National Surveys indicated that 80% of consumers worry about pesticide residues — especially on the food they feed their children. In 1993, a panel convened by the National Academy of Science reported the federal allowances for pesticide residues were too lenient, and that infants and children could be harmed by present residue levels that the government considers "legal."

The Environmental Working Group (EWG) (1998) study reported that out of every four child age five or under eats a peach or an apple, he or she is exposed to unsafe level of neurotoxic organophosphate (OP) insecticides. Thirteen (13%) percent of apples, 7.5% of pears, and 5% of grapes in the US food supply expose the average young child eating these fruits to unsafe levels. Many of these exposures exceed the federal safety standard by factor of 10 or more."The group added that millions of American children of the above-mentioned ages are at risk every year from ingesting dangerous levels of at least 13 different OP pesticide residues in their apples, applesauce, apple juice, peaches, popcorns, corn chips, and other "junk" foods (Cumins, 1999).

Feeling the heat of consumer concern, the Clinton/Gore administration announced that the EPA would be releasing a brochure supermarket to shoppers for that would outline precautions regarding "Pesticides on Food." Besides advice on scrubbing, washing, peeling,

and cooking fruits, particularly on apples, and vegetables, the EPA advised consumers concerning pesticides. Consumers are advised to purchase organically grown fruits, vegetables, and other foods (Cumins, 1999).

2. Experimental

The methodology applied for this study involved four methods: (1) Reviewing coverage in newspapers, journal articles, reports, and also internet during the explosion of the issue of Alar on apples from 1989. The journals and newspapers reviewed published more than 300 articles. In addition to that, the internet listed more than 600 sources. There found to be "good" and "bad" aspects about this growth regulator (Arbaat & Maimunah, 2004). Many played the story in the prime news sections, alerting people to possible problems. Those media included a large number of sources and provided the apple industry a prominent voice. More problematic was their concern about the Alar stories; (2) Requiring information, printed data, and telephone interview from the Environmental Protection Agency, Chicago Branch office; (3) Distributing of opinionnaire-questionnaire survey to the residents of Baptist Student Center (BSC) of Southern Illinois University at Carbondale, Illinois, and (4) Conducting additional opinionnaire-telephone interview to several selected apple orchard farmers in Carbondale and Murphysboro, on the issues of Alar on apples (Arbaat & Maimunah, 2004).

The information and data were organized in such manner to provide the picture about Alar issue on apples based on the four different above-mentioned methodologies.

3. Results and Discussion

The results of the issue were categorized based on these four factors:

(1) The journals and newspapers reviewed found to be publishing more than 300 articles providing information on facts, results of several toxicological tests, and also public concerned on Alar. The internet had listed more than 600 references presenting the same factors. Some experiments were conducted by Carson (1964), Oser (1966), Toth (1970, 1973 & 1977), the National Cancer Research Institute (1978 & 1979), Lapsley (1985), and the Environmental Working Group (1998), to

name a few, served as the toxicological basis, stated that Alar broke down into UDMH or 1,1-dimethyl-hydrazine, might be carcinogenic. After supplying UDMH in the drinking water of samples (rats and mice), there were found that samples developed several kind of cancers (kidney, liver, blood vessels, uterine, and blood vessels) (Ryan, 1966; Smith & Raso, 1999).

(2) The personnel of Illinois EPA Chicago Branch were helpful to provide printed materials and Fact Sheets, containing information related to Alar (Arbaat & Maimunah, 2004). A report issued by an environmental advocacy group on February 27, 1989, claimed that children face a massive public health problem from pesticide residue in food. This report found in a 2-year study that the allowable pesticides in farm produce caused cancer and nerve damage in children. The agency charges EPA with failing to take into account the exposure levels of children and infants when developing tolerance levels. Forefront in the public's eye is the issue of Alar on apples. According to them, effects on humans consuming fruits treated with this chemical are unknown. The toxicity studies were conducted using animals because to administer such chemical tests to human was illegal. The results, there was no epidemiological evidence at presents to any effects on humans from consuming apples treated with Alar.

(3) One-hundred fifty ($n=150$) questionnaire surveys were distributed to the residents of BSC, Southern Illinois University at Carbondale, Illinois, USA regarding their opinion toward the use of Alar. They returned the questionnaire surveys in two (2) days. The data gathered were tabulated and organized. The summary of their opinions of Alar on apples issue are as follow (see Fig 14) (Arbaat & Maimunah, 2004).

(a) Almost all of the Baptist Student Center (BSC) residents were **uncertain** if Alar was a health risk. They wanted more evidences in deciding about the safety of Alar;

(b) They were **uncertain** about laboratory tests using animals were consistent. Furthermore, they said they needed more knowledge and convinced data about the certainty in laboratory tests for humans;

(c) A high percentage of the residents concerned about chemicals on their food. Yet, they were **uncertain** whether or not to ban Alar. It was inferred that they lack of knowledge about spraying of Alar on apples; and

(d) The BSC residents were **uncertain** whether or not to ban Alar because the EPA had not decided to ban Alar. The ban was because of the tremendous influence of the media like newspapers, journals, and TV shows.

(3) The four orchard apple owners were interviewed by telephone. These are the summary of their opinions related to the Alar issue:

(a) The Grammers Orchards used Alar but discontinued applying it 1990. The owner disagreed to ban on the use of Alar because it was used mainly in banana, not on apples. However, the discontinuation had to be done because public displayed of an unease and concerned;

(b) The Flamms Orchards had discontinued applying Alar many years due to the scare that people would not buy their apples. The manager added that the Company experienced the decrease in purchasing of apples from public due to the Alar issue;

(c) The Eckert Orchards manager, Abe Craig, said that the company had discontinued using Alar many years due to public fear over Alar issue. In fact, he said that the use of Alar was good because it increased apple shelf life, provided pretty color, and a firmer texture. However, because of the concern about public views to maintain economy and security of the orchards, he had not use Alar on apples; and

(d) The manager of Minton Produce disagreed in banning of Alar. He said that the signs of not to apply Alar on apples was just gimmick. Alar did not pose any danger to human beings. He said that a person must consume 70,000 lbs apples treated with Alar to be at risk of cancer. He discontinued using Alar on his orchard because he was concerned about his economy.

4. Conclusions

Based on the issue and results discussed, these conclusions were made.

1. Experiments conducted in 1964, 1966, 1970, 1973, 1977, 1978, 1979, 1985, and 1998 using animal samples **did not** reflect exactly to human beings. The doses applied to the samples might also have different impacts if applied to humans.
2. The EPA **did not** confirm on the banning of Alar on apples. The data from the exact experiments and tests did not convince public that the application of Alar on apples was definitely dangerous and could cause other severe illnesses, not only to mention about cancers.
3. The Baptist Student Center residents said that majority of them did not have enough knowledge about Alar. They were **uncertain** whether or not to ban Alar, even though they concerned about chemicals in their everyday foods. Moreover, EPA also had not decided about banning of Alar. The tremendous influence on the banning was due to the media like newspapers, journals, and TV talk shows.
4. Mixed opinions were provided from the apple orchard owners interviewed. Majority of them were **unaware** that using Alar on apples posed dangers. However, they concerned about public views and at the same time needed to maintain economy and security of the orchards. As a result, they decided to discontinue using Alar.

Recommendations

Several recommendations were drawn based on the issue.

1. More experiments needed to be administered and conducted by the toxicological personnel and authorities like the EPA, NCRI, ACSH, and so on. The tests should provide convinced and reliable data on the impacts of Alar, especially in relation to human beings.
2. The EPA had to take a stand and confirmed decision about banning the use of Alar on apples and fruits. The data

from tests should be reliable and convince the public stating that the application of Alar on fruits was definitely dangerous and could cause severe illnesses. Therefore, public should not eat apples and/or its products.

3. The Baptist Student Center residents needed more exposure and knowledge about Alar. Several agencies (the EPA, NCRI, ACSH) could play their roles in the community by organizing and giving shows, talks, seminars, workshops, etc. on pesticides residue in foods and fruits that they consume everyday were safe from chemical, insecticide, pesticide, fungicide, etc.
4. Apple orchard owners needed more exposure and extra knowledge about applying the Alar and its effects on their crops, like vegetables and fruits, particularly apples they grow. If found that this chemical is really causing more dangers than the benefits, then they can decide whether or not to use Alar on their orchards. Therefore, they could decide to discontinue using Alar.

5. Acknowledgments

The writers wish to extend their gratitude to Ms "Sweet Pie" Candee Cole of Southern Illinois University at Carbondale, USA, for the cooperation and help in jointly gathering data from various agencies, like the residents of BSC, the EPA Chicago Branch, and apple orchard owners in Carbondale and Murphysboro during the study.

6. References

Arbaat & Maimunah. (2004 August). *The myth of Alar scare ...on apples?* Paper presented at the Annual Fundamental Science Seminar 2004 (AFSS 2004) on June 14-15, 2004 in Skudai Ibnu Sina for Fundamental Science Studies, Universiti Teknologi Malaysia.

Begley, S & Hager, M. (1989, March 27). A guide to the grocery. *Newsweek*. CXIII (13), 16-19.

Cumins, R. (1999, February 7). Food safety crisis in the U.S.A. *Motion Magazine*.

Environmental Research Foundation. (1989). *The Alar rebellion of 1989*. Annapolis, MD: Rachel's & Health Weekly. www.monitor.net/rachel/r535.html

GNU FDI. (2003). Alar on apples. www.disinfo.deia.org/wiki.phtml?title=Alar_and_apples

Hawley, G. (Ed.). (1981). *Alar. The Condensed Chemical Dictionary (10th ed.)* New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co.

JMPR. (1977). *Daminozide: pesticide residue in foods 1977 evaluation*.

Levendosky, C. (1984). Scratching the underbelly of the Oprah Lawsuit. *Casper Star Tribune*. 1-14.

Levendosky, C. (1998). Scratching the underbelly of the Oprah Lawsuit. *Casper Star Tribune*. 1-16.

Montague, P. (1997). The real story about Alar. *America, the Environment, and the Global Economy*, 1-14.

Negin, E. (1999). Ten years later, myth of 'Alar scare' persists. *Columbia Journalism Review*, 1-4.

Negin, E. (1989). The Alar scare was for real; and so is that "veggie hate-crime" movement. *Columbia Journalism Review*, 1-5

Raloff, J. (1985, September). EPA planned to ban carcinogen daminozide. *Science News*, 128 & 149.

Rosen, J. (Fall 1990). Much ado about Alar. *Issues in Science and Technology*, 85-90.

Ryer, F.H. (1966). Final Report: Radiotracer Metabolism Study, Alar -C¹⁴. Unpublished report from Hazleton Labs., Inc., submitted to the World Health Organization by the United States Rubber Company.

Shabecoff, P. (1989, February 2). Hazard reported in apple chemical: EPA cites risk of cancer but will not ban use yet. *The New York Times*, 138, A1-18

Smith K. & Raso, J. (1999). *Unhappy anniversary: the Alar 'scare' ten years later*. Washington, DC: American Council in Science and Health

Smith, K. (1998). Alar five years later. *The Washington Times*. American Council on Science and Health.

Wargo, J. (1996). *How a public health story becomes an industry legend*. Annapolis, MD: Island Press

Utilisation Of Bentonite As Adsorbent In Wastewater Treatment Of Alcohol Industry

Asep Supriatna, Hayat Sholihin, and Adi Pramono

Chemistry Department of Indonesia Education University

Jl. Dr. Setiabudi No. 229 Bandung, Indonesia 40154

Tlp./Fax. +62 22 2000579, e-mail: aasupri@upi.edu

Abstract

Utilization of bentonite in wastewater treatment of alcohol industry has been studied. The research was carried out to identify the effect of natural bentonite to the pollutant correspond of concentration, contact time and the synergetic effect of flocculants. The characterization of bentonite before and after contacting with sample was analyzed by SEM, IR and XRD. The concentration of pollutant in wastewater was measured by spectronic method. The result showed that the percentages of pollutant have decreased by 94% at 15 g natural bentonit addition to 50 ml wastewater. The contact time optimum was 15 minutes. The synergetic effect of superfloc is better than poly aluminum chloride (PAC).

Keyword: Bentonit, alcoholic wastewater, adsorbent, superfloc, PAC.

1. Introduction

Vinase wastewater is the residue of distillation of fermented cane (molasses), the other product is alcohol as distillate. The residue is a red-brown liquid, strong smell and has pH 4,2 – 4,5. It usually used as fertilizer to increase wheat production at Egypt (Rodriguez, 2000), because it consist of organic materials, potassium, calcium, nitrogen and phosphorus. The content of vinase depend on quality of cane and processes.

Generally, when afforded 1 liter of alcohol from distillation process, the residue of vinase is produced much higher in range of 10 to 15

times. It is depend of quality of cane and type of distillation processes.

Indonesia has a huge bentonite resources which spread out around, so it is easy to find and very cheap. Bentonite has been reported as a good adsorbent and ion exchange at many cases. Based on this characterization of bentonit it would be predicted as an alternative solution to treat the wastewater from alcohol industry easily and cheaply. The study will be conducted by investigation of activities and optimum condition of bentonite into wastewater from alcohol industry.

Table 1: The chemical composition of vinase waste water

Composition	Percentage
Mineral	29,0
Reduction sugar	11,0
Protein	9,0
Volatile acid	1,5
Gum	21,0
Acid lactic mixture	4,5
Organic acid mixture	1,5
Gleosal	5,5
Wax, phenol, metal, etc	17,0

2. Experimental

There are three steps of experiment such as initial characterization of bentonite and vinase, performance analysis, and final characterization of bentonite and vinase.

Preparation of sample

Sample of vinase was prepared as following; cane from PT.PGR II (300 – 330 g) was diluted with water up to 1 L, and mixed homogeneously. Yeast from PT. PGR II (5 g), urea from Tani Bakti Kopo 364 (10 g), and TSP from Tani Bakti Kopo 364 (5 g) were added and mixed together to the above solution. The mixture was incubated for 48 h at room temperature. The fermented solution was separated by distillation at 100°C. The distillate is alcohol and the residue is vinase.

Performance analysis

Effect of mixing time

Bentonite (10 g) was added into vinase (50 mL) as much as six beaker glasses. The mixture was stirred by variation of time in range between 15 to 180 minutes, at 193 rpm velocity. The mixture was left to precipitate down, and the supernatant was analyzed by mini UV spectrophotometer.

Effect of concentration

Vinase (50 mL) was placed at each six beaker glasses. The various amount of bentonite (between 7 to 25 g) was added to each beaker of vinase. The mixture was stirred by at 193 rpm velocity for 2 hours. The mixture was left to precipitate down, and the supernatant was analyzed by mini UV spectrophotometer.

Effect of addition of bentonite

This procedure was carried out to effective

determination addition 15 g of bentonite, whether 1 x 15 g or 3 x 5 g.

Final analysis

Bentonite (10 g) was added into vinase (50 mL) at beaker glasses. The mixture was stirred for 2 hour, at 193 rpm velocity. The mixture was left to precipitate down, and the supernatant was analyzed as final vinase, and precipitate was analyzed as final bentonite by infrared spectrophotometer.

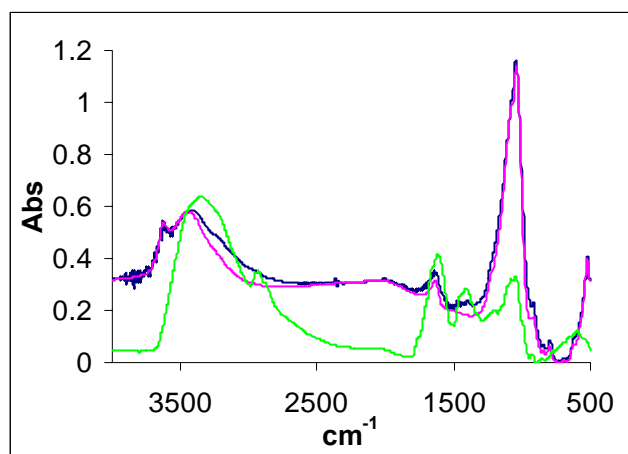
Characterization

Initial and final bentonite and vinase were analyzed by IR spectrophotometer and GCMS at Chemical Instrument Laboratory UPI, while Scanning Electron Microscope (SEM) analyzed was carried out at Puslitbang Geology Bandung. Chemical Oxygen Demand (COD) of initial and final vinase were analyzed at Puslitbang Technology Mineral dan Batubara Bandung, and color analyzed was placed at Environment Laboratory ITB.

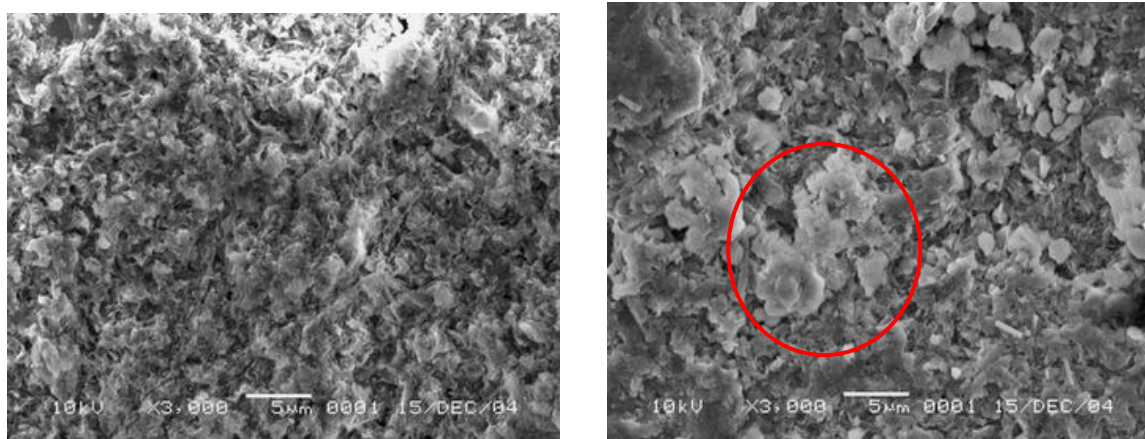
3. Result and Discussion

IR spectrum showed there are some alteration of hydration characterization, interlayer cation, and the presentation of water crystal at bentonite. Vibration of Si—O tetrahedral bonding is represented at wave number 524,6 and 470,6 cm^{-1} . While Si—O str was showed at 1643,2 cm^{-1} , H—O—H bend from water was adsorbed at 3448,5 cm^{-1} , and O—H str for octahedral layer was placed at 3625,9 cm^{-1} .

The final bentonite spectrum showed some Si—O vibr at 1500 – 1700 cm^{-1} ; 2372,3 cm^{-1} and 3000 – 4000 cm^{-1} . From the IR spectrum as well showed that vinase was adsorbed by bentonite at interlayer phase. However, the



Picture 1. IR Spectrophotometer (a.) initial bentonite, (b.) vinase, and (c.) final bentonite.



(a) (b)

Picture 2. SEM of (a) initial bentonite and (b) final bentonite.

Table 2. The GCMS analysis of vinase.

No	Initial		Final	
	Retention Time (minute)	Concentration (%)	Retention Time (minute)	Concentration (%)
1.	21,068	1,14	2,598	9,63
2.	21,878	19,20	2,705	3,96
3.	22,357	31,09	9,089	1,49
4.	22,579	7,22	15,020	15,76
5.	22,747	6,99	19,432	2,73
6.	25,068	0,96	19,905	39,67
7.	25,150	14,76	28,117	2,59
8.	25,200	4,96	29,658	8,58
9.	25,317	1,40	30,473	8,88
10.	25,450	3,48	30,473	3,19
11.	25,592	2,25	31,775	2,09
12.	26,783	1,79	31,917	1,43

monmorilonite structure was not significant change, as shown at Picture 1, spectrum (a) is initial bentonit and (c) is final bentonit.

Spectrum (b) is a vinase, showed that O—H vibr was absorbed at $3355,9\text{ cm}^{-1}$; C=O str of carboxylic acid at 1624 cm^{-1} ; O—H vibr at $1415,7\text{ cm}^{-1}$. C—H vibr at $\text{CH}_2\text{—O}$ or $\text{CH}_3\text{—O}$ at $2935,5\text{ cm}^{-1}$ and $1045,3\text{ cm}^{-1}$, as primer alcohol, meanwhile secondary alcohol was absorbed at $1080,1\text{ cm}^{-1}$, and C—O str carboxylic acid was appeared at $1203,5\text{ cm}^{-1}$.

Scanning Electron Microscope (SEM) with 3000 X enlargements showed that difference between initial bentonite microstructure. Picture 2b showed that clumps spread out over the bentonite surface. It is indicated that vinase has been adsorbed into bentonite surface.

The result analysis of vinase by GCMS showed that vinase contains some compounds as presented at Table 2. The final vinase spectrum

showed that there are some new peaks have appeared and some disappeared. The disappeared peaks correspond to compound which have been adsorbed by bentonite, at retention time between 21 to 26 minutes in different intensities. Mean while the new appeared peaks were predicted as the rest of used coagulant and formation of new compounds.

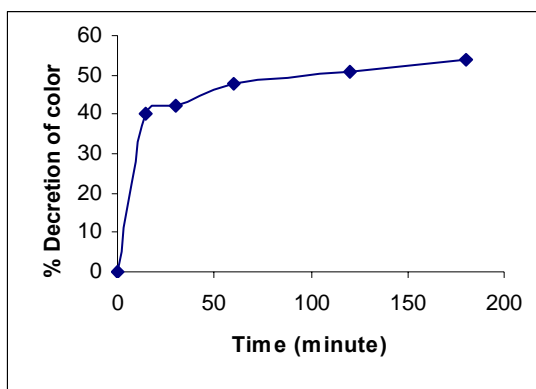
Performance Analysis

1. Time of Mixing

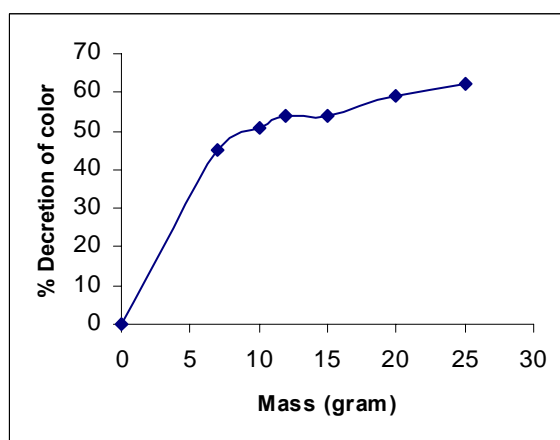
Intensity of color of the mixture was monitored during reaction was going on. The intensity of color was strongly decreasing up to seven minutes reaction. After that it was decreased slowly, as shown at Graphic 1.

2. Concentration of bentonite

The vinase color was decreased depend on addition of bentonite to the solution. However,



Graphic 1. Relationship between contact time and percentage of color



Graphic 2. Relationship between mass of bentonite and intensity of color

after 10 gram addition of bentonite the intensity of color was decreased slowly and look stable, as shown at Graph 2.

The graphic 2 showed as representation of exponential equation of $\%Abs = (2,72)^{4,34} \cdot (m)^{0,239}$. Where m is bentonite mass, and %Abs is decreasing of vinase color.

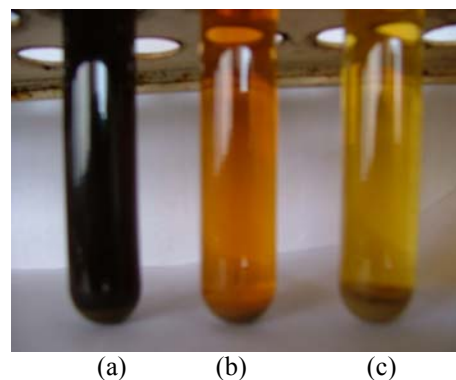
3. Type Addition of Bentonite

The way of addition bentonite to the vinase solution caused to differ of bentonite performance. Addition of bentonite into vinase solution gradually is much better rather than wholly up to 7 % difference. The result can be shown at Table 3.

When analyzing bentonite activity upon color intensities, it was able to reduce color intensity up to 93%. Furthermore, bentonit can also reduced COD value up to 84% by adition

Table 3. Type of addition of bentonite

No.	Mass (gram)	% Decretion of COD
1	15 gram	77
2	5 gram (3 x pengulangan)	84



Picture 3. The difference color of (a) initial vinase, (b) after adding 15 g bentonit, and (c) after adding 3 x 5 g of bentonite

gradually. While addition of bentonite wholly could only reduced until 77%.

The difference color intensity of (a) initial vinase, (b) after adding 15 g bentonit, and (c) after adding 3 x 5 g of bentonite, as shown at picture 3.

4. Conclusion

Bentonite is able to utilize as adsorbent in treatment vinase wastewater of the alcohol industry. It would give the best activity by stepwise addition to the wastewater, and has reduced COD up to 84%, color intensity by 93%. The spectrum data shown that interaction between bentonite and vinase are adsorption.

5. References

Sayed, Arafat dan Yassen Abd Elazim. *Agronomic Evaluation of Fertilizing Efficiency of Vinasse*. Paper no. 1991. [online]: www.revfacagronluz.org.ve [12-10-2004]

Table 4: Analysis result of vinase

No	Parameter	Unity	Initial	Final	% Decreasing
1.	COD	mg/l	224.400	36312	84
2.	Color	PtCo	112500	7500	93

Asep Supriatna, Hayat Sholihin, and Adi Pramono

- Rodríguez, J. Gómez y O. (2000). *Effects of vinasse on sugarcane (Saccharum officinarum) productivity*. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 17:318-326. [online] <http://www.ldd.go.th> [12-10-2004]
- Potter, C., M. Soeparwadi, dan aulia Gani. (1994). *Limbah Cair Berbagai Industri di Indonesia. Sumber, Pengendalian, dan Bahan baku*. Project of The Ministry of State for The Environment, Republic of Indonesia and Dalhousie University, Canada. Indonesia: Environmental Management Development in Indonesia.
- Cortez, L.A.B. dan Pérez, L.E.B. (1997). Experiences on vinasse disposal part III: combustion of vinasse-# 6 fuel oil emulsions. Brazilian Journal of Chemical Engineering vol. 5. Tersedia: <http://www.scielo.br/> [19-10-2004]
- Puslitbang Geologi (P3G) Prosedur Pemotretan Scanning Electron Microscope (SEM), JSM-35 C. Bandung. Tidak Diterbitkan. (*in press*)
- Katti, Kalpana dan Katti, Dinesh. (tanpa tahun). *Effect Of Clay-Water Interactions On Swelling In Montmorillonite Clay*. [online] <http://www.ce.washington.edu/em03/proceedings/papers/812.pdf>



Production and Acute Toxicity Studies Of Fungal (*Cunninghamella elegans* 2A1) Oil Rich In γ -Linolenic Acid

Ayub Mohd Yatim^a, Mohd Khan Ayob^a, Suriah Abd Rahman^a,
Osman Hassan^a, Wan Mokhtar Wan Yusoff^b, Aidil Abd Hamid^b,
Mohd Sharizan Ahmad Shahrifun^a, Syahida Maarof^a

^aSchool of Chemical Science and Food Technology,

^bSchool of Bioscience and Biotechnology,

Faculty of Science and Technology,

University Kebangsaan Malaysia, 43650 Bangi.

email : amy@pkriscc.chem.ukm.my

Abstract

A fungus, Cunninghamella elegans 2A1 was found to be a potential candidate for production of lipid rich in γ -linolenic acid (GLA). This study was carried to culture the fungus, obtain its lipid / oil, to analyse the fatty acid composition and to develop preliminary safety assessment on the extracted lipid by LD₅₀ test. Submerged shaken flask fermentation system with a defined growth medium was employed to culture the mycelium. Fermentation was carried out for 8 days before harvesting the culture. Mycelia obtained were freeze-dried before its lipid / oil was extracted using ethanol and hexane. The amount of oil extracted was calculated and, its fatty acid profile was analyzed using gas chromatography technique. The 8 day culture was able to produce 0.2g oil / g biomass containing 7.2% GLA in a basal culture medium. The fungus produced 0.5g oil / g biomass containing 6.34% GLA when 5 ml/L sunflower oil was added into the basal medium. 2000mg/kg extracted lipid was administered to groups of rats in LD₅₀ test and neither significant toxic sign nor death observed during the test and this shows that LD₅₀ dose of Cunninghamella elegans 2A1 extracted lipid is greater than 2000mg/kg.

Key words: polyunsaturated fatty acid, γ -linolenic acid, fungal oil, fermentation, GC (gas chromatography), LD₅₀

1. Introduction

Long chain polyunsaturated fatty acid with 20 and 22 carbon atoms (LC-PUFA) are integral constituents of biological membranes. Bound to phospholipids, there are involved in the regulation of functional properties like fluidity, permeability and the activity of membrane bound enzymes. The human body can synthesize this LC-PUFA, which are, arachidonic (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) from the essential fatty acid gamma linolenic acid (GLA, 18:3 n-6) and alpha linolenic acid (ALA, 18:3 n-3), respectively, by elongation and desaturation. [Hempenius et al., 1997]

Previous cytotoxicity studies report shows that variety of human cancer cells of different tissue

origin cultured in vitro were killed following exposure to certain PUFAs at concentrations which had no lethal effect on non-tumorigenic cells either cultured separately or co-cultured with tumorigenic cells. Gamma-linolenic acid (GLA) has been demonstrated to be the most effective differential cytotoxic agent among the different PUFAs tested (Hrelia et al., 1996). Alison Colquhoun (2002) study show that the dietary supplementation of standard rat chow with 5.5 % GLA has been reported to cause 47.5% inhibition of tumor growth in the walker 256 tumour in vivo. This suggest that, the incorporation of GLA in dietary intake might suppressed the growth of tumor in cancer patient or potential human cancer candidates, and for non-potential human cancer candidates,

GLA would be the precursor of arachidonic acid (AA), which is found abundantly in neural tissue such as brain and retina.

Cunninghamella elegans 2A1 fungus was found to be a potential candidate in production of oil rich in GLA, and also will be use in rich GLA supplement production. Previous study shows that toxicity studies on fungus, namely *Mortierella alpina*, which also an oil rich in GLA producer, has been extensively studied since its oil has been used in infant milk fortification. This paper will represent the LD₅₀ test report on this *Cunninghamella elegans* 2A1 oil as a preliminary step to develop safety assessment on this fungal oil.

2. Eksperimental

Fermentation

Pure culture *Cunninghamella elegans* 2A1 fungus was obtained from Department of Microbiology, University Kebangsaan Malaysia, cultured on potato dextrose agar. Control growth culture was made by inoculating 1 cm²/L of pure culture into 5 liters of growth medium as describe by Kendrick & Ratledge (1992) contained glucose (50g/L, separately sterilized) and 1g/L ammonium tartrate, 7g/L potassium dihydrogen phosphate, 2g/L disodium hydrogen phosphate, 1.5g/L magnesium sulphate, 1.5g/L yeast extract, 1 ml/L trace elements and 5 ml/L sunflower oil in 5 conical flask (2 liter conical flask) with continuous shaking in an environ shaker (30°C, 250rpm) for 8 days. The same method and material goes for sunflower oil added culture by adding in the medium.

Lipid extraction

The fungi were harvested after eight days fermentation and freeze dried before undergo lipid extraction using ethanol-hexane double extraction method as described by Certik et al (1996). Lipid-ethanol containing fraction was evaporated before added into hexane-lipid containing fraction and evaporated again. Percent lipid yield was calculated before preparing for lipid profile analysis.

Lipid profile analysis

Lipid samples were converted to their constituent fatty acid methyl ester (FAME) by the method of Timms (1978). Routine analysis of the FAME was carried out using a capillary Gas Chromatograph (GC-Agilent 6890 Series

Automated) with a BPX-70 (Supelco Inc. USA) column (60 m length X 0.32 µmid). Carrier gas used was helium at a linear velocity of 25 cm/s (1.7 ml/min). Split injection with a split ratio of 10:1 was applied. The temperatures of injection port and FID detector were 250°C and 280°C, respectively. Column temperature was maintained at 200°C (isothermal heating) and nitrogen flow was 0.6 (ml/min). Compounds were tentatively identified by comparing the retention time of Fatty Acid Standards (Supelco Inc. USA).

Acute Study

Acute study was perform by LD₅₀ test. Sprague-Dawley rats of both sexes were obtained from the Medical Faculty of University Kebangsaan Malaysia's Animal House (Kuala Lumpur). The animals were acclimatized for 2 weeks before any treatment proceeded. All the animals were fasted from food but not water 24 hours before treatment. We expected that this fungal oil would be relatively safe because it was extracted using very low toxic solvents and was evaporated thoroughly. Thus, a single high dosage, as described by Ryu et al. (2004), of 2000 mg/kg, was administered by gavages to 10 male and 10 female rats weighing 150 - 200g and water was given to 10 male and 10 female as control group. After a single administration, sign of possible toxicity were observed every hour for the first 6 hours and every day for 14 days.

Statistics

The results are expressed as means ± standard deviation (S.D.). The data were analyzed by Independent-Samples T-test, using SPSS version 10. Statistical significance was set at the 0.05 levels.

3. Result and Discussion

Lipid Production

Table 1 shows total biomass, total lipid extract, percent lipid yield and GLA weight percentage of control fermentation and sunflower oil added fermentation. For total biomass, there is no significant difference between the control fermentation and sunflower oil added fermentation. Addition of sunflower oil in the growth medium significantly increased the lipid yield and percent of lipid yield as compared to the control group.

Table 1. Mean total biomass, total lipid extract, percent lipid yield and GLA weight percentage of control and sunflower oil added fermentation.

	Control fermentation (n=3)	Sunflower oil added fermentation (n=3)
Biomass (g)	62.33 ± 41.72	58.17 ± 15.37
Lipid yield (g)	11.83 ± 2.89*	32.27 ± 9.49*
Percent lipid yield (%)	22.51 ± 8.07*	56.42 ± 0.00*
GLA weight percentage (%)	7.20 ± 0.67	6.34 ± 1.35

* = Significant difference between control & sunflower oil added fermentation, p<0.05

The GLA weight percentage of sunflower oil that was added to the fermentation is 0.03 ± 0.02 percent (n=3) and this figure is nearly negligible compared to the control fermentation and the sunflower oil added fermentation. Statistic analysis shows that there is no significant difference on GLA percentage between control fermentation and sunflower oil added fermentation although there is a slight difference, when the data was observed visually. Results suggest that *Cunninghamella elegans* 2A1 was using the exogenous fatty acids from medium by incorporate the fatty acids and transform them to longer and more unsaturated state.

Acute Toxicity Study

To establish the safety, LD₅₀ test was conducted. 2000mg/kg *Cunninghamella elegans* 2A1 fungal oil was administered to both sexes of rats. Neither significant toxic signs nor death was observed during the observation period. Therefore, the oral LD₅₀ of *Cunninghamella elegans* 2A1 fungal oil was clearly greater than 2000mg/kg in rats.

4. Conclusion

Addition of sunflower oil into the fermentation significantly increased the lipid yield and percentage of the lipid yield without significantly altered the GLA percentage. The LD₅₀ dose for this fungal oil is clearly greater than 2000mg/kg in rats.

5. References

Certik M., Andrasi P., Sajbidor J. (1996). Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid

composition of lipid classes containing γ -linolenic acid extracted from fungi. *JAOCS* 73: 357-365.

Colquhoun A. (2002). Gamma-linolenic acid alter the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. *Biochemica et Biophysica Acta* 1583: 74-84.

Hempenius R. A., Van Delft J. M. H., Prinsen M., Lina B. A. R. (1997). Preliminary Safety Assessment of an Arachidonic Acid-enriched Oil derived from *Mortierella alpina*: Summary of Toxicological Data. *Food & Chemical Toxicology* 35: 573-581.

Hrelia S., Bordoni A., Biagi P., Rossi C. A., Bernardi L., Horrobin D. F., Pession A. (1996). Gamma-linolenic Acid Supplementation Can Affect Cancer Cell Proliferation via Modification of Fatty Acid Composition. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 225: 441-447

Kendrick, A & Ratledge, C. (1992). Lipid of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 27:15-20.

Ryu S. D., Park C. S., Baek H. M., Baek S. H., Hwang S. Y., Chung W. G. (2004). Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 75-80.

Timms, R.E. (1978). Artifact peaks in the preparation and gas chromatography determination of methyl ester. *The Australia J. Of Dairy Tech.*: March 1978: 4-5.

Pemodelan Maklumat Biodiversiti: Pendekatan Objek Digital Informatif

Ashraf Jaradat¹, Aziz Deraman¹, Sufian Idris¹, Laily Din² & Nizam Said²

¹Fakulti Teknologi Dan Sains Maklumat
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM BANGI, Selangor
Malaysia

²Fakulti Sains Dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM BANGI, Selangor
Malaysia

Abstrak

Untuk memenuhi keperluan penyedia maklumat, konsep objek digital (DO) menyediakan satu penyelesaian untuk menguruskan kompleksiti kepelbagaian jenis bahan dalam perpustakaan digital. Namun demikian, banyak kerja terdahulu mempunyai kelemahan sebagai berikut: sistem perpustakaan digital tidak mempunyai sistem pengecaman pengetahuan yang mencukupi yang boleh dicapai berikutan kekurangan perwakilan komponen DO; sebahagian pengetahuan diasing dan diabaikan yang pada hakikatnya boleh dihasilkan daripada dokumen perpustakaan digital; pelaksanaan DO yang lazim hanya menyediakan perwakilan statik dengan menakrifkan komponennya sebagai dataset. Dalam kertas ini, konsep DO dikembangkan menjadi kontena teknikal untuk kepelbagaian pengetahuan yang boleh dirujuk sebagai objek digital informatif (iDO). Konsep iDO ini akan memudahkan mekanisme pengorganisasian dan perwakilan tradisional pengarkiban sistem maklumat kepada pangkalan pengetahuan. Dengan itu, pertanyaan berkaitan dengan pengetahuan iDO boleh dibuat secara lebih dinamik dan pintar. iDO juga boleh digabungkan dalam repositori utama Sistem Pengarkiban Pengetahuan Biodiversiti (BioKAS) untuk memudahkan manipulasi maklumat dan pengetahuan objek digital.

1. Pendahuluan

Pada hari ini, maklumat boleh wujud dalam pelbagai bentuk dan yang paling terkini adalah perwakilan digital. Untuk memenuhi keperluan masa kini, kewujudan perwakilan digital menjadi usaha menubuhkan perpustakaan digital sebagai satu halatuju yang kita telah nantikan begitu lama. Untuk memudahkan pengurusan perpustakaan digital, konsep objek digital telah diperkenalkan sebagai kaedah perwakilan maklumat yang mampu mengurangkan kompleksiti pengurusan. Namun demikian, banyak kerja terdahulu mempunyai kelemahan sebagai berikut: sistem perpustakaan digital tidak mempunyai sistem pengecaman pengetahuan yang mencukupi yang boleh dicapai berikutan kekurangan

perwakilan komponen DO; sebahagian pengetahuan diasing dan diabaikan yang pada hakikatnya boleh dihasilkan daripada dokumen perpustakaan digital; pelaksanaan DO yang lazim hanya menyediakan perwakilan statik dengan menakrifkan komponennya sebagai dataset. Sistem maklumat hari ini harus menunjukkan maklumat sebagai gabungan imej, teks, video, suara dan berbagai bentuk jenis data bermultimedia yang lain. Perolehan maklumat ini dengan kaedah dan perwakilan yang berbagai boleh didapati daripada berbagai sumber yang boleh menjadi satu kantung pengetahuan yang mampu berkembang.

Kaedah perwakilan pengetahuan menggunakan Objek Digital (DO) telah digunakan dalam

berbagai projek seperti Kahn & Wilensky dan Warwick Framework (Lagoze et al., 1996; Daniel and Lagoze, 1997; Daniel et.al.). Model yang lebih terperinci seperti model FEDORA (Daniel et al. ; Payette and Lagoze, 1998), model CNRI (Bianchi dan J. Petrone, 2001) dan model DUSHAY [8] menjadi asas kepada pembentukan perpustakaan digital. Pada asasnya konsep DO mewakili entity logical yang komponen utamanya adalah berbentuk digital dan menjadi kandungan kepada perwakilan perpustakaan digital.

Namun demikian, dengan DO sebagai satu konsep baru yang masih terbuka dari segi pelaksanaannya, penjenisan kandungan yang diwakilkannya menyebabkan penggabungan maklumat masih sukar sukar untuk disusun dan diwakilkan untuk menjadikannya sebagai satu petunjuk pengetahuan yang bermakna dan berguna. Oleh yang demikian, kertas ini cuba membincangkan pengembangan konsep DO menjadi lebih dinamik. Konsep objek digital informative (iDO) diperkenalkan dengan kantung pengetahuan yang lebih jelas semantikanya untuk sesuatu perwakilan DO. Secara khususnya iDO ini difokuskan kepada biodiversiti flora dan fauna yang mempunyai potensi untuk diwakilkan pengetahuannya secara lebih berkesan. Konsep iDO ini akan memudahkan mekanisma pengorganisasian dan perwakilan tradisional pengarkiban sistem maklumat kepada pangkalan pengetahuan. Dengan itu, pertanyaan berkaitan dengan pengetahuan iDO boleh dibuat secara lebih dinamik dan pintar. iDO juga boleh digabungkan dalam repositori utama Sistem Pengarkiban Pengetahuan Biodiversiti (BioKAS) untuk memudahkan manipulasi maklumat dan pengetahuan objek digital. Seksyen berikut akan membincangkan rangkakerja DO dan diikuti dengan perbincangan berkaitan dengan model DO. Selepas itu satu cadangan rangkakerja objek digital informatif akan dibincangkan dengan terperinci.

2. Rangkakerja Objek Digital

Pendekatan objek digital merupakan kaedah yang selesa untuk menggambarkan item maklumat. DO menyediakan perantaraan untuk menyusun dan mengenalpasti kandunagn atau maklumat bagi penyimpanan, capaian dan penagihan. Dalam skop yang dibincangkan di sini, terdapat dua rangkakerja yang dikira

menjadi asas kepada pembentukan model DO yang lebih maju, iaitu rangkakerja Kahn & Wilensky dan Warwick. Kedua-dua rangkakerja ini menjadi asas kepada pembentukan pakej bebas-kandungan (Kahn and Wilensky, 1995) atau sebagai kantung pakej metadata (Lagoze et al., 1996). Kedua-dua rangkakerja ini dibina dengan matlamat untuk mewakili data dan metadata dalam objek perpustakaan digital di persekitaran terangkai.

Rangkakerja Kahn & Wilensky boleh dianggap sebagai asas kepada pembentukan konsep DO. Ia menakrifkan entiti asas suatu infrastruktur yang menyokong kelas maklumat digital teragih seperti perpustakaan digital. Rangkakerja ini secara tak rasmi menakrifkan DO sebagai “struktur data dengan komponen utamanya adalah bahan digital atau data termasuk suatu pencam yang unik yang dipanggil pengendali. Seterusnya penakrifan yang lebih formal dibuat dengan DO sebagai suatu kewujudan jenis data abstrak yang mempunyai dua komponen iaitu *data* dan *metadata-kunci*. Berasaskan data dan metadata-kunci, penakrifan DO boleh dikembangkan untuk menjadikan pengendalian repositori dalam pelbagai bidang aplikasi lebih mudah.

Rangkakerja Warwick pula dibina sebagai cara untuk untuk menguruskan pakej metadata ke dalam kantung dengan menyediakan hubungan eksplisit antara pakej-pakej dalam kantung dengan menakrifkan abstraksi baru yang dipanggil Katalog Rangkakerja Warwick (WFC). WFC menyediakan senarai pakej individu dan hubungan antara mereka. WF menakrifkan DO sebagai kantung yang mempunyai tiga pakej metadata yang berbeza iaitu Mudah: pakej set metadata yang mengandungi metadata sebenar; Pakej Tak Langsung: pakej yang tak perlu dimasukkan dalam kantung (ianya boleh dicapai menggunakan rujukan seperti URL); Pakej Kantung: kantung itu sendiri. Kantung boleh wujud dalam dua bentuk sama ada “transient” atau “persistent”. Dalam “transient”, kantung wujud sebagai objek pengangkutan antara repositori, pelanggan dan agen. Dalam “persistent”, ianya wujud sebagai objek kelas-pertama dalam infrstruktur maklumat yang boleh dinamakan dan distor dalam satu atau lebih pelayan, direplikasikan, dan dicapai

daripada pelayan-pelayan ini menggunakan pencam capaian global (URI).

Bagaimanapun, WF dan katalog hanya menyediakan model yang berhubungan dengan metadata sahaja. Oleh itu rangkakerja Hubungan Aktif Teragih (DAR) telah dibangunkan yang mengembangkan WF dengan mengitlakkan rangkakerja yang membenarkan kantung mememgang atau merujuk semua sumber dan bukan sahaja metadata. Tahap perbezaan hubungan antara data dan metadata tidak penting bagi DAR, namun terdapat kepelbagaian perbezaan antara sumber data yang perlu dipertimbangkan (Daniel and Lagoze, 1997). Kaedah URL (Uniform Resource Locator) atau URN (Uniform Resource Names) boleh menjadi contoh penggunaan hubungan dalam WFC. Penamaan hubungan antara dataset dan menggunakan pencam seperti demikian amat memudahkan penjanaan pencam unik untuk hubungan seperti ini. Pengitlakkan ini menyediakan satu model yang baik untuk mewakili data dan metadata dalam perpustakaan objek digital denagn persekitaran terangkai. Sumber boleh dikaitkan tanpa menghiraukan di mana lokasinya, dan hubungan antara sumber-sumber ini boleh diperolehi dan dilaksanakan di mana-mana sahaja dalam rangkaian. Tahap perkaitan seperti ini membolehkan data berada dalam satu repositori dengan pemerihalannya berada dalam repositori yang lain.

3. Model Objek Digital

Kajian dan penggunaan DO masih baru dan memerlukan lebih banyak penyelidikan dibuat dalam bidang aplikasi ayang berbeza. Penyelidikan oleh Kahn & Wilensky membolehkan pemahaman rangkakerja yang lebih baik untuk dikaitkan dengan pemodelan DO. Namun demikian, rangkakerja ini hanya membolehkan pemahaman konsep dibuat tanpa dijelaskan keupayaan sebenar pelaksanaan DO dalam bidang aplikasi yang dipilih. Oleh itu, berikut ini dibincangkan tiga model DO yang lebih terperinci iaitu FEDORA, CNRI dan Dushay.

FEDORA (*Flexible and Extensible Digital Object and Repository Architecture*) adalah model DO yang merupakan senibina DO dan repositori terbuka yang dibina untuk menyediakan kaedah terbaik untuk menyimpan, pencapaian dan mengagihkan kandungan

digital (Payette and Lagoze, 1998; Payette et al., 2002). FEDORA menggunakan konsep rangkakerja Warwick yang telah dikembangkan dengan memenuhi keperluan rangkakerja Kahn & Wilensky berkaitan dengan syarat kebenaran, DO sebagai bebas-kandungan, dan pengagihan. Dengan membina di atas rangkakerja Warwick, ia membenarkan aggregasi kandungan tempatan dan teragih. Dengan pembangunan menggunakan abstraksi DAR, FEDORA membenarkan pengagihan daripada aggregasi kandungan (Daniel et al.).

Senibina FEDORA adalah struktur perkhidmatan multi-lapis yang termasuk perkhidmatan:

- *repositori* yang menyediakan mekanisme untuk menginput, menyimpan dan mencapai objek digital;
- *indeks* yang menyediakan mekanisme bagi penemuan objek digital;
- *pungutan* yang menyediakan kaedah aggregasi objek digital dan perkhidmatan untuk menjadi koleksi yang bermakna;
- *penamaan* yang mendaftar dan mendapatkan nama yang unik secara global untuk objek digital;
- *antaramuka pengguna* yang menyediakan pintu laluan untuk mendapatkan perkhidmatan lain.

DO mempunyai pencam kekal unik (PID), satu atau lebih penyebar, satu atau lebih “datastream” dan metadata sistem. Salah satu ciri penting DO FEDORA adalah keupayaannya mengaggregasikan kedua-dua kandungan (data dan metadata) dan kelakuan. (perkhidmatan). Kedua-dua unsur ini boleh diagihkan dan dirujuk melalui URI (Payette and Staples, 2002) yang distorkan dalam repositori.

Senibina CNRI pula memudahkan pengurusan kandungan dan perkhidmatan perpustakaan digital dalam konteks persekitaran teragih melaui pgunaan mekanisme penjenisan objek digital teragih. CNRI membenarkan DO dianggap sebagai “gist key” yang diperihalkan melalui penggu aan penjenisan abstrak “jenis kandungan” dengan matlamat pencipta DO memperihalkan objek dengan menakrifkan set pandangan yang boleh diperolehi daripadanya (Bianchi dan Petrone, 2001). CNRI juga

memperkenalkan set perkhidmatan teras untuk pengenalan, capaian dan pengurusan DO yang mewakili fungsian minimum yang perlu untuk interoperabiliti. Repositori DO pula bertindak sebagai antaramuka luaran untuk penciptaan, modifikasi, penyimpanan dan capaian DO. Senibina boleh mempunyai bilangan repositori yang tidak terhad yang boleh dicapai oleh DO masing-masing dengan menggunakan RAP (Repositories Access Protocol).

Model Dushay memperkenalkan mekanisme "Broker Context" (CB) yang membenarkan pemisahan mekanisme kelakuan daripada kandungan digital yang mampu mengekang mekanisme kelakuan berlebihan kepada DO dengan format kandungan yang bersesuaian secara dinamik dan tempatan. Dushay juga mengatakan yang metadata struktural memainkan peranan utama untuk memisahkan kandungan digital daripada "pengalaman" kandungan berkenaan. Petaan hubungan antara komen dalam DO dibuat dengan mengumpukkan label atau secara hirarki atau kedua-duanya.

CB bertindak sebagai komponen utama senibina Ia menguruskan interaksi mekanisme kelakuan dengan kandungan objek dengan mendapatkan metadata structural tentang kandungan berkenaan dan memadankan metadata structural berkenaan kepada mekanisme kelakuan yang bersesuaian yang menghasilkan "pengalaman" kandungan. Di sini, senibina Dushay memisahkan penyimpanan DO, mekanisme kelakuan dan persembahan kandungan digital. Senibina Dushay mewakili DO dalam format XML. Kandungan DO pula sepadan dengan data XML dan mekanisme kelakuan pula beranalogi dengan gaya helaian XSLT untuk memastikan fleksibiliti, interoperabiliti dan pelbagai pilihan persembahan. Perincian persembahan DO Dushay boleh dilihat dalam (Dushay, 2002).

Kebanyakan definisi mempersembahkan DO sebagai data dan metadata. Namun demikian keperluan dalam pemodelan pengetahuan untuk flora dan fauna umpamanya jauh lebih kompleks yang perlu menyokong dua keperluan. Ianya mesti menyediakan kaedah untuk mengumpulkan DO dan mesti ada kaedah capaiannya. Oleh itu, boleh dikatakan definisi konsep DO semasa mempunyai beberapa kekurangan sebagai berikut:

- Rangkakerja terdahulu tidak menyediakan peluang untuk menjelaskan DO dalam bentuk yang lebih dinamik terutama berkaitan dengan hubungkait pengetahuan sesuatu DO
- Kebanyakan DO hanya meliputi pelaksanaannya sebagai sistem maklumat tanpa meliputi penakrifan pengetahuan tentang DO yang lebih terkamir
- Penakrifan DO sebagai dataset hanya menjadikannya lebih statik
- Penakrifan data dan metadata masih terhad kepada pengumpulan data yang banyak dan sukar untuk memisahkannya kepada data, maklumat dan pengetahuan

Oleh yang demikian, satu penakrifan yang lebih jelas diperlukan supaya konsep DO boleh diperluaskan lagi. Kita tidak hanya tertarik kepada kepelbagaian bentuk dan jenis DO seperti teks, imej, suara, video dan sebagainya malah hendaknya memahaminya dalam konteks pengetahuan yang ada bersamanya.

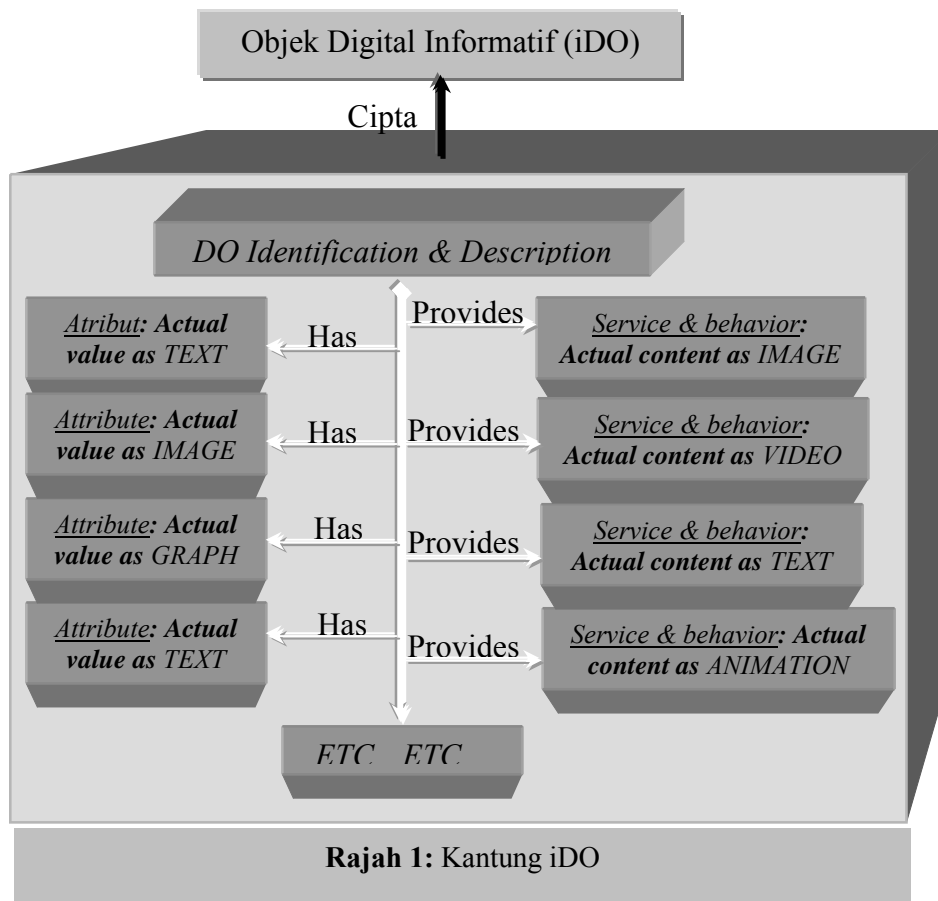
4. Pemodelan Objek Digital Informatif

Untuk memenuhi kekurangan dalam definisi DO sedia ada, dicadangkan supaya definisi DO dapat memenuhi keperluan DO masa kini. DO masa kini lebih berbentuk multimedia, dan setiapnya mempunyai banyak maklumat dan pengetahuan (sekeping gambar membawa seribu makna). Oleh demikian, definisi DO harus dikembangkan kepada Objek Digital Informatif atau iDO yang boleh dijelaskan sebagai:

Suatu kantung (objek kompleks) yang boleh dikenalpasti secara unik yang mengumpul dan mempersembahkan komponen multi-entiti yang berkaitan dalam bentuk atau aspek kandungan sebenar. iDO ini dalam wujud dalam bentuk campuran melalui perkaitan antaranya dengan penjelasan tentang had dan pengetahuan bagi objek dunia nyata.

Konsep iDO di atas memenuhi prinsip-prinsip berikut:

- Kandungan DO dibahagikan kepada tiga paras iaitu data, maklumat dan pengetahuan. Ini memaksa perwakilan DO menjadi lebih informatif dan bertindak sebagai stor pengetahuan.



Rajah 1: Kantung iDO

- iDO terbentuk oleh kepelbagaian komponen yang direalisasikan oleh hubungan. Oleh itu penakrifan hubungan berasaskan kandungan sebenar komponen amat penting.
- Komponen boleh datang dengan berbagai jenis data seperti teks, audio, imej dan sebagainya.
- Kepelbagaian hubungan membolehkan pengetahuan sesuatu DO dibina dan diperbanyakkan dengan sistematik.

Oleh itu, boleh difahamkan yang kantung iDO adalah satu blok pengetahuan yang besar mengenai sesuatu objek melalui pembolehubah, peristiwa, lokasi, perkhidmatan atau unsur lain seperti yang ditunjukkan oleh Rajah 1.

Seperti yang dibincangkan, iDO mewakili objek dunia nyata sebagai campuran maklumat digital atau multimedia melalui kandungan komponen masing-masing. Oleh yang demikian, komponen iDO boleh dibahagikan kepada tiga bahagian yang penting iaitu:

Atribut

Terdapat ciri pada setiap objek yang menunjukkan ciri yang stabil dan membuatkan

objek boleh ditakrif dengan baik. Atribut objek biasanya tetap tetapi nilai semasa mungkin dinamik dan inilah yang mencirikan iDO yang boleh dikelaskan sebagai mudah atau kompleks. Pembolehubah mudah boleh jadi berjenis primitif seperti integer, real atau string. Pembolehubah kompleks boleh mengandungi koleksi jenis-jenis item atau maklumat. Sebagai contoh:

iDO 1 mempunyai bentuk:bulatan; warna:hitam; saiz: besar

iDO 2 mempunyai bentuk:bersegi; warna:biru; saiz: kecil

Setiap iDO mempunyai ciri yang sama seperti bentuk, warna, saiz dan seterusnya, namun setiap satu objek mungkin memiliki nilai yang berbeza.

Perkhidmatan / Aplikasi

Tiada objek boleh wujud sendirian melainkan bergantung dengan pihak lain. Oleh itu, apa sahaja yang objek boleh buat dinyatakan dalam bentuk perkhidmatan. Sebagai contoh, penemuan tumbuhan tongkat ali bukan sahaja menjadi ramuan ubatan malah telah menjadi ramuan untuk minuman. Minuman ini sebenarnya adalah di luar objek "tongkat ali"

itu sendiri. Berasaskan kepada nilai semasa, perkhidmatan spesifik objek boleh jadi mudah atau kompleks.

Hubungan

Komponen ini memberikan penyatuan semantic beberapa komponen objek untuk membentuk pengetahuan. Hubungan ini boleh diumpukkan secara menegak atau mendatar. Hubungan mendatar menggabungkan item di bawah paras yang sama untuk menghasilkan maklumat umum yang boleh menjelaskan iDO yang berlainan. Hubungan menegak pula menggabungkan kumpulan komponen yang berkaitan pada paras yang berlainan untuk menunjukkan iDO yang spesifik.

5. Kesimpulan

Kertas ini telah membincangkan pelbagai isu untuk perwakilan Do yang dilihat menjadi semakin penting terutama sekali dalam pemodelan flora dan fauna. Kesungguhan penyelidikan dalam pemodelan DO ini amat perlu untuk memudahkan penyediaan repository pengetahuan yang lebih mudah difahami dan digunakan. Dengan cadangan penggunaan model iDO, kandungan sesuatu DO boleh dikembangkan tahap pengetahuan kepada produk yang lain tetapi masih berpautan dalam bentuk hubungan mendatar atau menegak. Kaedah iDo ini diharapkan akan memberi satu pendekatan baru untuk memastikan pemodelan reposiotri pengetahuan akan terus cekap dan berkesan.

6. Daftar Pustaka

Bianchi, C. dan Petrone, J. 2001. An Architecture for Digital Object Typing. Corporation for National Research Initiatives (CNRI). (Online) <http://www.cnri.reston.va.us/software/repository/repo-whitepaper.pdf> (02-Mar-04).

Daniel, R.J. dan Lagoze, C. 1997. Distributed Active Relationships in the Warwick Framework. *Proceeding of the 1997 IEEE Metadata Conference*. (Online)

[http://www.computer.org/proceedings/meta97/papers/rdaniel/rdaniel.pdf\(24-03-04\)](http://www.computer.org/proceedings/meta97/papers/rdaniel/rdaniel.pdf(24-03-04)).

Daniel, R.J., Lagoze, C. dan Payette, S.D. A Metadata Architecture for Digital Libraries. *Proceedings of the IEEE International Forum on Research and Technology Advances in Digital Libraries, ADL*. Pages: 276-288.

Dushay, N. 2002, Localizing experience of digital content via structural metadata, *Proceedings of the second ACM/IEEE-CS joint conference on Digital libraries*. Pages: 244 -252.

Kahn, R. dan Wilensky, R. 1995, A Framework For Distributed Digital Object Services. *Corporation for National Research Initiatives (CNRI)*. (Online)

<http://www.cnri.reston.va.us/home/cstr/arch/k-w.html> (4-Jan-2004).

Lagoze, C., Lynch, C.A. dan Daniel, R. 1996. The Warwick Framework: A Container Architecture for Aggregating Sets of Meta data. *D-Lib Magazine*. Technical Report, Cornell University. (Online)

<http://www.dlib.org/dlib/july96/lagoze/07lagoze.html> (01-Mar-04).

Payette, S. dan Lagoze, C. 1998. Flexible and Extensible Digital Object and Repository Architecture (FEDORA). *Proceedings of the Second European Conference on Research and Advanced Technology for Digital Libraries*. Lecture Notes in Computer Science, Volume 1513, pages: 41-59.

Payette, S. dan Staples, T. 2002. The Mellon Fedora Project. *Proceedings of the 6th' European Conference on Research and Advanced Technology for Digital Libraries, ECDL*. Volume 2458 /2002, Pages: 406 -421.



Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Lipase Dari Kompos

B. V. E. Viera, F. Madayanti dan Akhmaloka

Departemen Kimia FMIPA
Institut Teknologi Bandung
loka@chem.itb.ac.id

Abstrak

Proses-proses industri yang menggunakan lipase umumnya berjalan pada temperatur di atas 45°C, karena itu penelitian mengenai lipase yang berasal dari bakteri termofilik penting untuk dilakukan. Bakteri termofilik diisolasi dari sampel pengomposan limbah organik ketika berada pada tahap termogenik, dan dapat ditumbuhkan pada suhu 50, 60 dan 70°C pada media yang mengandung olive oil sebagai sumber karbon terbesar. Uji mikroskopis memperlihatkan isolat yang didapatkan berbentuk basil dan kokus. Identifikasi bakteri penghasil lipase dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media Nutrien Broth dan media termus yang mengandung substrat lipid 1%. Inkubasi dilakukan mulai pada suhu 50°C hingga 70°C. Isolat yang mempunyai aktivitas lipolitik ditandai dengan terbentuknya halo (zona bening) atau pendar fluoresens merah-oranye di sekitar koloni.

Paper is not available

Genetic Variation of Malaysian Banded Leaf Monkey Inferred from Mitochondrial DNA Cytochrome-b Sequences

Badrul Munir Md-Zain¹, Vun Vui Fui¹, Zainal Zahari Zainuddin², Mahani Mansor Clyde¹

1) School of Environmental and Natural Resource Sciences
Faculty of Science and Technology,

2) Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor
Jabatan PERHILITAN, Cheras, Kuala Lumpur
email: abgbadd@pkriscc.ukm.my

Abstract

We present the molecular study to examine the genetic variation of Malaysian Banded leaf monkey. We sequenced 500 base pairs of the mitochondrial DNA (mtDNA) (Cyt-b gene). Three subspecies of Malaysian banded leaf monkey were used including *Presbytis melalophos siamensis*, *P. m. robinsoni* and *P. m. cruciger*. Our interpretation based on distance analysis suggests that *siamensis* has a distant relationship with *robinsoni* as compared to *cruciger* while *robinsoni* has a closed relationship with *cruciger*. Results provide some genetic information that can be used to characterize genetic structure at subspecific level. Later, the final results can be translated for conservation and management of Malaysian banded leaf monkey.

Keywords: *Malaysian Banded Leaf Monkey, Primates, Mitochondria, Cyt-b DNA Sequences.*

1. Introduction

Banded leaf monkey, *Presbytis melalophos*, has a large number of subspecies that can be distinguished from other *Presbytis* by differences in adult male loud calls (Wilson and Wilson, 1975, 1977) and a great diversity of adult pelage coloration (Aimi et al., 1986; Aimi and Bakar, 1992). This polytypic species is distributed on the Southeast Asian mainland (Southern Thailand and Malay Peninsula), as well as on Sumatra, Borneo, and other small islands of the Indonesian archipelago (Wilson and Wilson, 1977; Aimi and Bakar, 1992; Payne and Francis, 1985).

Recently, the subdivision of *P. melalophos* members into three distinct species (*siamensis*, *femoralis* and *melalophos*) is based on the emphasis of morphological features like coat coloration (Brandon-Jones et al. 2004). Wilson and Wilson (1977) and Kawamura (1984) argued for the separation of *femoralis* from *melalophos* based on adult male loud calls. However, a number of primatologists do not agree with the three species, 15 subspecies

arrangement. Many still favor the retention of *P. melalophos* as a single polytypic species with numerous subspecies. For example, Oates et al. (1994), on the basis of ecological and behavioral data, retained *siamensis* and *femoralis* as subspecies of *melalophos*.

We believe that the systematic arrangement of taxa previously classified as *P. melalophos* should be reanalyzed to resolve what has emerged as a difficult phylogenetic puzzle. Previous phylogenetic hypotheses have been based on morphological, ecological and behavioral data. There have been no studies of molecular genetic variation directed at this issue. Thus, it is valuable to determine how different genetically the individuals within the subspecies are from one another and what the phylogenetic relationships are among the molecular sequences they contain. To achieve this goal we begin with sequencing Cyt-b gene of some individuals of Malaysian Banded leaf monkey. The genetic distance generated by distance analysis could provide us a preliminary clue on inter-taxon phylogenetic

Table 1. Details of genetic samples.

<i>P. melalophos siamensis</i>	BM21	Besut, Terengganu, Malaysia
<i>P. melalophos siamensis</i>	BM22	Besut, Terengganu, Malaysia
<i>P. melalophos siamensis</i>	BM23	Besut, Terengganu, Malaysia
<i>P. melalophos siamensis</i>	BM24	Besut, Terengganu, Malaysia
<i>P. melalophos robinsoni</i>	BM27	Ulu Kenas, Kuala Kangsar, Perak, Malaysia
<i>P. melalophos robinsoni</i>	BM28	Ulu Kenas, Kuala Kangsar, Perak, Malaysia
<i>P. melalophos robinsoni</i>	BM30	Redang Panjang, Selama, Perak, Malaysia
<i>P. melalophos robinsoni</i>	BM33	Redang Panjang, Selama, Perak, Malaysia
<i>P. melalophos robinsoni</i>	BM105	Sarawak, Malaysia

Table 2. Oligonucleotide primer pair used in this study and its PCR conditions

Forward/Reverse Primer Sequences	L14724: 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'
Cyt-b	H15149:5'-AAACTGCAGCCCCTCCGAATGATATTTGTCCTCA-3'

relationships.

2. Experimental

Taxa sampled

All samples used in this research are listed in the Table 1. We used three subspecies of *Presbytis melalophos* (*siamensis*, *robinsoni* and *cruciger*). Several institutions had provided us with necessary facilities and assistance for tissue sample collection including Jabatan Perhilitan Malaysia and Wildlife Conservation Society.

DNA sequencing

To reflect sequence variation in mitochondrial DNA (mtDNA), we chose the Cyt-b gene. We extracted total DNA from tissue and blood using phenol chloroform extraction method (Hillis *et al.* 1996). L14724 dan H15149 (Table 2) were used as the main primers to amplify the Cyt-b gene (Kocher *et al.* 1989). PCR products were cleaned using the Qiagen PCR Purification Kit and made ready to proceed with sequencing by an ABI 377 PRISM automated DNA sequencer (Perkin Elmer).

Sequence Alignment and Data Analyses

Alignment of mtDNA sequences as made by codon position, using ClustalX. Sequence data from this study were analyzed using distance method under PAUP version 4.0 (Swofford, 1999). We conducted neighbor joining analyses based on the distance measure of Kimura 2 Parameters.

3. Results And Discussion

Figure 1 shows the successful amplification of Cyt-b DNA for *Presbytis* and *Trachypithecus*

(Md-Zain *et al.* 2005). For the successful amplification, the reactions of the PCR should consist of 5 µl 10X PCR buffer, 1 µl 10mM dNTPs, 3.0 µl 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µl 20 pmol/primer, 0.5 µl 2.5U *Taq polymerase*, 2.0 µl DNA template and 37.5 µl ddH₂O. The final total volume was 50 µl. The PCR process should follow 30 cycles of denaturation (1 min; 94°C), annealing (1 min; 55°C), extension (1 min; 72°C) and final extension (10 min; 72°C). The estimated PCR product size for this gene fragment was around 500 basepairs. The same PCR condition for denaturation, annealing and extension is also obtained in *Rhinopithecus* (Li *et al.* 2004).

Table 3 and 4 show the genetic distance obtained from NJ analyses of the Cyt-b mtDNA dataset. Average percent sequence divergence among *melalophos* members is calculated using Kimura 2 Parameters. The average genetic distance among the *siamensis* ranges from 0 % to 0.5 %, whereas among the *robinsoni* the average genetic distances ranges from 0 % to 6.8 %. The inter subspecific average genetic distance between *siamensis* and *robinsoni* is 6.0 %, between *siamensis* and *cruciger* is 5.2 %. Additionally, *robinsoni* is only differs at 3.4 % from *cruciger*.

If phylogenetic separation in *melalophos* group was worthy of species status, then the genetic distances among the putative *P. melalophos* species should be in the range found among the widely accepted *Presbytis* species (Md-Zain 2001). The tree topologies and the genetic distances estimated by Md Zain (2001) and

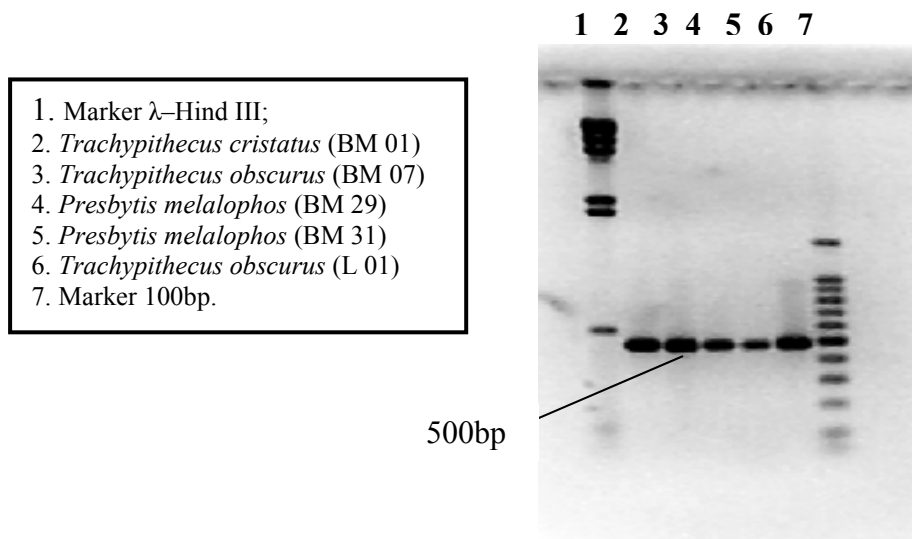


Figure 1. Purified PCR Product of Cyt-b DNA (Md-Zain et al 2005)

Table 3. Average percent sequence divergence among and between *siamensis* and *robinsoni* using Kimura 2 paramater

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>P. m. siamensis</i> BM21	-								
2 <i>P. m. siamensis</i> BM22	0.226	-							
3 <i>P. m. siamensis</i> BM23	0.457	0.224	-						
4 <i>P. m. siamensis</i> BM24	0.457	0.224	0.000	-					
5 <i>P. m. robinsoni</i> BM27	7.651	7.372	7.112	7.119	-				
6 <i>P. m. robinsoni</i> BM28	7.878	7.563	7.339	7.315	0.000	-			
7 <i>P. m. robinsoni</i> BM30	4.286	4.500	4.776	4.761	6.591	6.796	-		
8 <i>P. m. robinsoni</i> BM33	4.790	4.517	4.783	4.784	6.055	6.050	0.458	-	
9 <i>P. m. cruciger</i> BM105	5.262	5.119	5.249	5.232	6.299	6.247	0.917	0.231	-

Md- Zain *et al.* (2002) contradict the Brandon-Jones *et al.* (2004) classification, showing little phylogenetic separation of one subspecies from another. Indeed, to the extent that one can identify groupings within *P. melalophos*, they do not coincide with those listed by Brandon-Jones *et al.* (2004) *P. f. femoralis* does not group with the *P. f. robinsoni*, nor does *P. s. siamensis* group with *P. s. natunae*.

In this study, using Cyt-b mtDNA, the final conclusion cannot be made until the sequences of *femoralis*, *cruciger* and *chrysomelas* are obtained from several individuals. However, based on the genetic distance, the pattern shows

that there is a big separation between *siamensis* and *robinsoni*. Surprisingly, there is also a big genetic distance between 2 population of *robinsoni* (Kuala Kangsar and Selama) at 6.4 %. This finding of course warrants special attention from molecular and morphological approaches to define the intersubspecific population differences.

This study's results are particularly relevant to the systematics of the Malaysian Banded leaf monkey and Asian Leaf monkeys in general. The data presented here can be used as an important source to define conservation and management units of Banded leaf monkeys.

Table 4. Summary average percent sequence divergence among and between *siamensis* and *robinsoni* using Kimura 2 paramater

Cyt-b	<i>siamensis</i>	<i>robinsoni</i>	<i>cruciger</i>
<i>siamensis</i>	0.265		
<i>robinsoni</i>	6.034	6.373	
<i>cruciger</i>	5.216	3.424	-

Table 5. Average percent sequence divergence among and between *siamensis* and *robinsoni* using the Tajima and Nei method (Md-Zain 2001)

	ND3/ND4		TSPY/SRY		IRBP	
	<i>siamensis</i>	<i>robinsoni</i>	<i>siamensis</i>	<i>robinsoni</i>	<i>siamensis</i>	<i>robinsoni</i>
<i>P.m.siamensis</i>	0.914		-		0.000	
<i>P.m.robinsoni</i>	1.843	1.227	0.034	0.000	0.000	0.000

However, only after comprehensive data matrix of Banded leaf monkeys completed with genetic distance and tree topologies, then such units can be defined.

4. Acknowledgements

We kindly appreciate Faculty of Science and Technology (UKM), Jabatan PERHILITAN and the Government of Malaysia. Special thanks to several institutions that provide us with necessary facilities and assistance for tissue sample collection including Jabatan Perhilitan Malaysia and Wildlife Conservation Society. This research is made possible under grant IRPA 08-02-02-0019 EA 301.

5. References

Aimi, M. and Bakar, A. (1992). Taxonomy and distribution of *Presbytis melalophos* group in Sumatera, Indonesia. *Primates* **33**: 191-206

Aimi, M., Hardjasmita, H. S., Sjarmidi, A., and Yuri, D. (1986). Geographical distribution of *Ayguia*-group of the genus *Presbytis* in Sumatra. Kyoto University Overseas Report of Studies on Asian Non-Human Primates **5**: 45-58.

Applied Biosystems, Inc., A Division of Perkin-Elmer Corporation (1994). AutoAssembler, DNA sequence assembly software.

Brandon-Jones D, Eudey AA, Geissmann T, Groves CP, Melnick DJ, Morales JC, Shekelle M, Stewart C-B. (2004) Asian Primate Classification. *International J. Primatology* **25**: 97-164.

Hillis, DM, Moritz, C, & Mable, BK. (1996). *Molecular systematics* 2nd edition. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A.

Kawamura, S. (1984). Distribution and vocalization of *Presbytis melalophos* and *P. femoralis* varieties in

westcentral Sumatra- a summarized report. Kyoto Univ. Overseas Rsch. Rep Studies on Asian Non-Human Primates **3**: 37-44.

Kocher, TD, Thomas, WK., Meyer, A, Edwards, SV, Paabo, S, Villablanca, FX, & Wilson, AC (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6196-6200.

Li, M, Wei, F, Huang, C, Pan, R & de Ruiter, J (2004). Phylogeny of Snub-nosed monkeys inferred from mitochondrial DNA, Cytochrome B, and 12S rRNA sequences. *International Journal of Primatology* **25**: 861-873.

Md-Zain, B.M. (2001). Molecular systematics of the genus *Presbytis*. PhD thesis. Columbia University.

Md-Zain, B.M., Hassan, M.H. & Melnick, D.J, (2002) Defining evolutionary significant units for *Presbytis melalophos* conservation using mitochondrial DNA sequences, *Proceedings Regional Symposium on Environment and Natural Resources*. Bangi, Selangor 279-286.

Md-Zain, B.M., Vun, V.F, Zainal, Z.Z., & Clyde, M.M. (2005). Pengoptimuman tindakbalas berantai polimerase (PCR) fragmen gen sitokrom-b bagi lutong *Presbytis* dan *Trachypithecus*. *Prosiding Seminar IRPA RMK-8 Kategori EAR, 2005*. 112-114.

Oates, J. F., Davies, A. G. and Delson, E. (1994). The diversity of living colobines. In Davies, A. G. and Oates, J. F. (eds), *Colobine monkey: their ecology, behavior and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 45-73.

Payne, J. and Francis, C. M. (1985). *A field guide to Mammals of Borneo*. Sabah Society, Sabah, Malaysia.

Badrul Munir Md-Zain, Vun Vui Fui, Zainal Zahari Zainuddin, Mahani Mansor Clyde

Swofford, D. L. (1999). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version v4.0b2, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.

Wilson, W. L. and Wilson, C. C. (1975). Species-specific vocalizations and the determination of phylogenetic affinities of the *Presbytis aygula-melalophos* group in Sumatra. In Kondo, S., Kawai,

M., and Ehara, A (eds). Basel: S. Karger, Contemporary Primatology, pp. 459-463.

Wilson, C. C. and Wilson, W. L. (1977). Behavioral and morphological variations among primate population in Sumatra. *Yearbook of Physical Anthropology* **20**: 207-233.



Heavy Metals Migration Beneath Unlined Waste Disposal Site At Dengkil, Selangor, Malaysia

Abdul Rahim Samsudin ¹, Bahaa-eldin Elwali A.Rahim ², Wan Zuhairi Wan Yacob ³, and Abdul Ghani Rafek ⁴

- 1) Geology Program, School of Environment and Natural Resources Sciences, UKM, Bangi, 43600, Malaysia
e-mail: abrahim@pkrisc.ukm.my
- 2) Geology Program, School of Environment and Natural Resources Sciences, UKM, Bangi, 43600, Malaysia
e-mail: bahaa_wali@yahoo.com
- 3) Geology Program, School of Environment and Natural Resources Sciences, UKM, Bangi, 43600, Malaysia
e-mail: yaacobzw@pkrisc.cc.ukm.my
- 4) Geology Program, School of Environment and Natural Resources Sciences, UKM, Bangi, 43600, Malaysia
e-mail: aghani@pkrisc.ukm.my

Abstract

Heavy metals namely Cu, Cr, Ni, Zn, Pb, and Co in soil horizons beneath the Ampar Tenang waste disposal site at Dengkil, Selangor were extensively studied through chemical analyses of twenty-one representative triplicate soil samples. The soil samples were collected from nine augered boreholes. Three of the boreholes are located within the disposal site and three each in the upstream and downstream regions outside the disposal area. Soils sampled from the soil-waste interface (ATI) within the dumping site indicated relatively high concentration of most of the heavy metals analyzed compared to those of samples collected from an upstream area (ATU) of the dumping site. Whereas soil samples from a down stream area (ATD) show slightly elevated concentration of heavy metals. The results of chemical analyses reveal that Cr, Zn and Pb had higher levels of concentration among all examined heavy metals. It was found that in most cases, the heavy metals concentrations were generally high within the soil of near surface layer and then they appear to decrease with increasing depth. It was noticed that, in addition to the vertical infiltration of leachate from the solid waste, the increase of groundwater level has also a strong influence on the contaminants dispersion in soils below the waste site.

Keywords: Leachate, Soil contamination, Chemical analysis, Heavy metals, Groundwater.

1. Introduction

Landfilling which is still the most popular form of municipal solid waste treatment in many countries now, takes up lots of areas and leads to a serious pollution to its surroundings (Ding *et al.*, 2001). The most common heavy metals in the landfills are iron (Fe), cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn), and nickel (Ni) (Erses and Onay, 2003). In addition to the vertical infiltration of leachate from the solid waste, the hydrological regime of groundwater also has a

strong impact on the contaminant distribution in soils below the landfill (Ahel *et al.*, 1998). The investigation of the chemical impacts on the soil in the vicinity of an uncontrolled combustion of municipal solid wastes in an open landfill in Crete area in Greece indicated that, high contaminants concentrations levels were found in the soil inside the landfill and in the immediate proximity (Martens *et al.*, 1998).



Figure 1. Location map of the study

Description of the study area

The study area is located in the Sepang district, some 3 km to the southwest of Dengkil town in Selangor, Malaysia. It is located at coordinates N 02° 48.925' and E 101° 4.933' according to Trimble differential Global Positioning System (GPS) setting (Figure 1). This area lies within the Langat river basin and characterized by generally flat lowlands where oil palm plantation and urban land uses are dominating over the tropical forests which covers the south to southwestern part of the area. The site is an open tipping site, which receives 100 tons per day of mainly domestic waste. The thickness of the disposed waste ranges between 4.5 m to 9 m with an average of 6.63 m.

The high ground rises between 30 m to 60 m. This is mainly covered by residual soils, derived from the weathering of foliated metasedimentary rocks, which are inferred to be the Kenny Hill Formation comprising essentially sandstone, shale, phyllite and quartzite (Mineral & Geoscience Department, 2001; Omar *et al.*, 1999). In the low flatlands, thick Quaternary layers are deposited on the bedrock. It consists of 0.5 to 5.5 m thick Beruas Formation with peat layer at the top, the clayey Gula Formation and the Kempadang

Formation (Mineral & Geoscience Department, 2001; Bosch, 1988). Immediately, below the peat there is a layer of very soft-to-soft compressible marine clay (Omar *et al.*, 1999). The residual soil is typically firm to stiff, becoming very stiff and hard sand silty clay with increasing depth (Omar *et al.*, 1999). This study has been performed mainly to define the total content and migration of heavy metals in the soil beneath the dumping site which has no liner to protect the very shallow groundwater zone (Figure 2) from the leachate seepage.

2. Experimental

Twenty one triplicate representative soil samples were collected from nine hand-augered holes using a standard procedure described by U.S. EPA (2000) (Figure 2). The holes were distributed among three locations within the study area. These include downstream (ATD), soil-waste interface (ATI), and upstream (ATU) areas of the study site. The latter is considered as a control sample. Each hole was sampled at intervals of 25 cm from the ground surface downwards to depth of 150 cm. Samples were packed in plastic bags before sending to the laboratory. The soil samples were air-dried at room temperature for 2 weeks. Using a ceramic pestle and mortar,

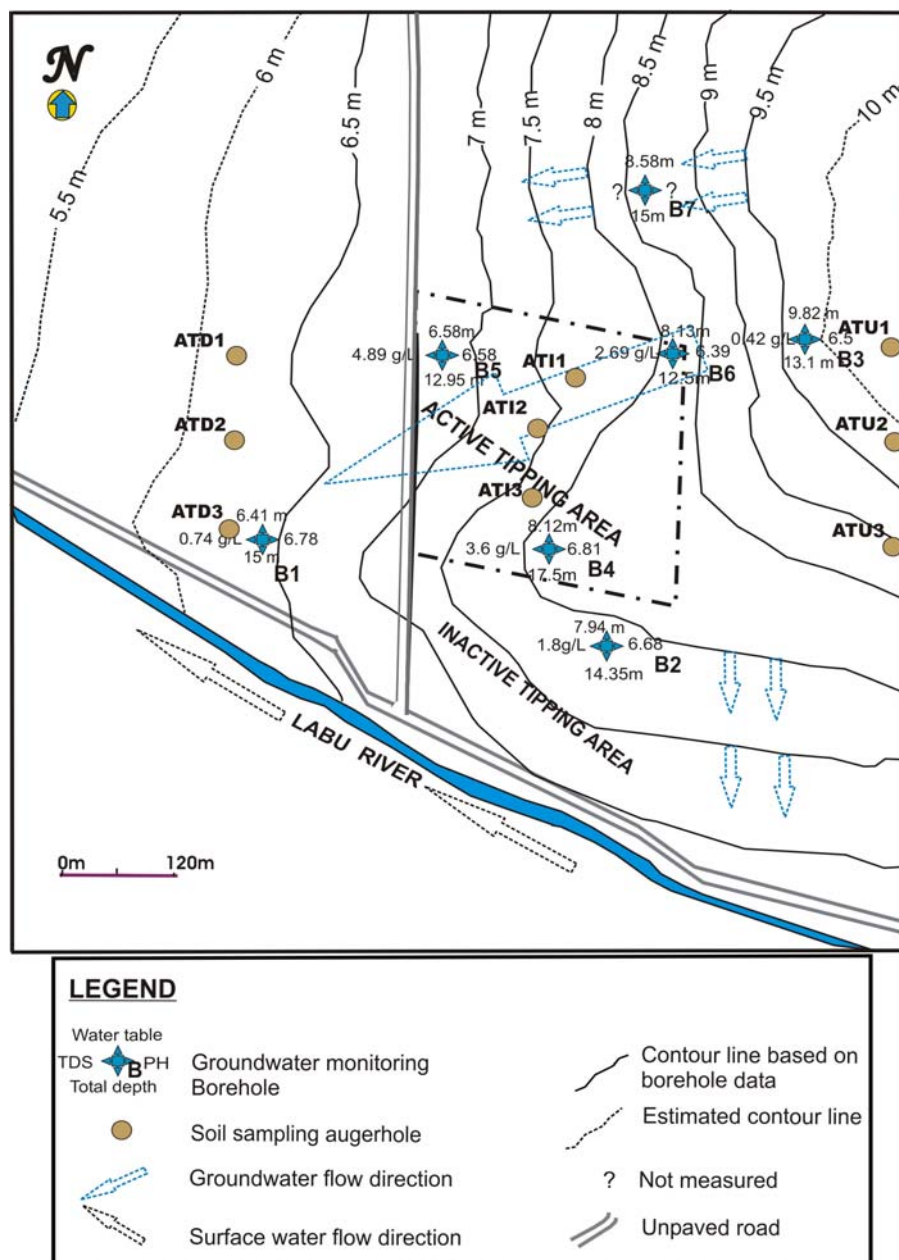


Figure 2. Layout of Ampar Tenang open-tipping showing the locations of auger-holes, groundwater monitoring boreholes, and general trend of groundwater flow direction

samples were gently ground and passed through sieve No. 2 mm. Then the soil samples of particles < 2 mm were preserved in sealed plastic bags before laboratory analysis. pH was measured using procedure described by ISO (1994). Microwave oven dissolution procedure described by Lamthothe *et al.* (1986) was used to determine the concentration of heavy metals in soil; in that, 1.0-gram sample, ground to pass 100 mesh, was placed in a 250-mL polycarbonate bottle. Then 2.0 mL of concentrated nitric acid (HNO₃) was added to the bottle, followed by 5.0 mL of 7:3 mixture

of hydrochloric-hydrofluoric acid (HCL-HF). Samples were then placed into the microwave oven and heated with 650 watt for 15 minutes. After cooling, 93.0 mL of 15 % boric acid (H₃BO₃) solution was added to each bottle. Then the bottles were recapped and returned to the oven and heated again at 650 watt for 15 minutes. After cooling to room temperature, the solutions were analyzed for heavy metals by spectrometry of atomic emission (ICP) using inductively coupled plasma of solid state (Perkin-Elmer model Optima 4300 Dual View). Concentrations obtained were

expressed in mg/kg. The statistical analyses were performed using the SPSS FOR WINDOWS statistical software package, Release 11.50 (6 Sep. 2002). Statistical differences between the means were compared using least significant differences at probability $P \leq 0.05$ (significant) and $P \leq 0.01$ (very significant).

3. Results

The study area is covered by a thin layer (50 cm) of dark brown spongy amorphous peat at the surface which, underlain by a very soft compressible clay. This clay is light grey in colour and is a very soft to very stiff sandy and silty clay. The soils in the vicinity of Ampar Tenang site were characterized by acidic pH of mean values ranging between 2.44 to 3.01. There was no change in pH with depth except for the ATD soil samples, which showed slightly decrease with depth of up to 70 cm and then remained unchanged (figure 3).

Results of total concentrations and vertical migration of the analyzed heavy metals are illustrated in Table 1 and Figures 4 to 6. However, among all the analyzed heavy

metals, only Cr, Zn, and Pb distributed considerably differently ($P \leq 0.01$) throughout the area, whereas Ni showed significant distribution difference at $P \leq 0.05$. However, Cu and Co were distributed insignificantly.

The vertical distribution of the most of the analyzed elements along the soil profiles (i.e. ATU, ATI, and ATD) exhibits notable decrease with increasing depth depending on the location of the profile. Nevertheless, some elements showed irregular migration patterns (e.g. Cu, Co, Cr). On the contrary, Zn and Pb concentration exhibits sharp increase at a depth below 40 cm before showing the usual behavior of the downward-decrease with increasing depth.

4. Discussion

The most contaminated soil in the present study occurs in areas, where extensive wastes had been disposed (ATI) as shown in Table 1. Thus, the high concentrations of these metals especially, Zn, Pb and Cr at ATI locations were directly attributed to the release of contaminated leachate generated from decomposed garbage.

Table 1. Mean Values \pm Standard Deviations for Soils Heavy Metals at ATS ^a

Metal ^b	ATS
Cu upstream	0.28 \pm 0.02
Cu interface	2.21 \pm 1.17
Cu downstream	0.54 \pm 0.36
Co upstream	0.13 \pm 0.20
Co interface	0.79 \pm 0.35
Co downstream	0.14 \pm 0.18
Cr upstream	1.06 \pm 0.40 **
Cr interface	11.51 \pm 2.12 **
Cr downstream	2.59 \pm 1.00 **
Ni upstream	0.82 \pm 0.18 *
Ni interface	4.35 \pm 0.97 *
Ni downstream	1.81 \pm 0.92 *
Zn upstream	1.57 \pm 0.33 **
Zn interface	12.97 \pm 5.28 **
Zn downstream	5.41 \pm 1.09 **
Pb upstream	1.36 \pm 0.58 **
Pb interface	12.78 \pm 1.48 **
Pb downstream	3.38 \pm 1.07 **

^a $n = 21$; ATS: Ampar Tenang soil; Concentration in Mg/Kg

^b upstream= ATU; interface= ATI; downstream= ATD

** Means are very significant at $P \leq 0.01$

* Means are significant at $P \leq 0.05$

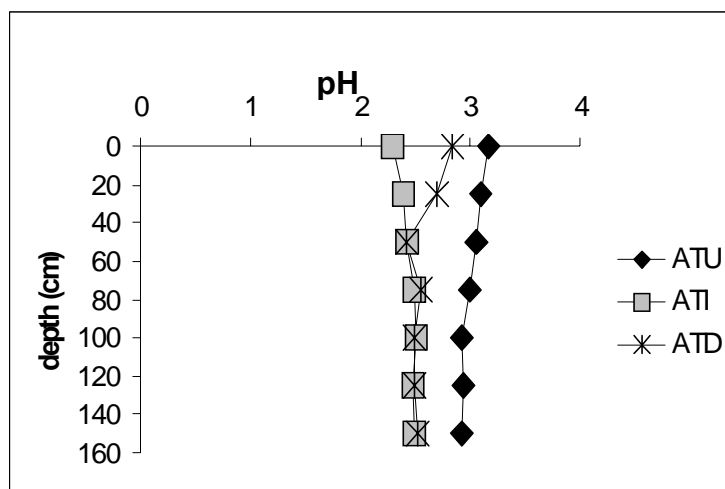


Figure 3. Variations of pH versus depth of different Soil Profiles at Ampar Tenang open-tipping site

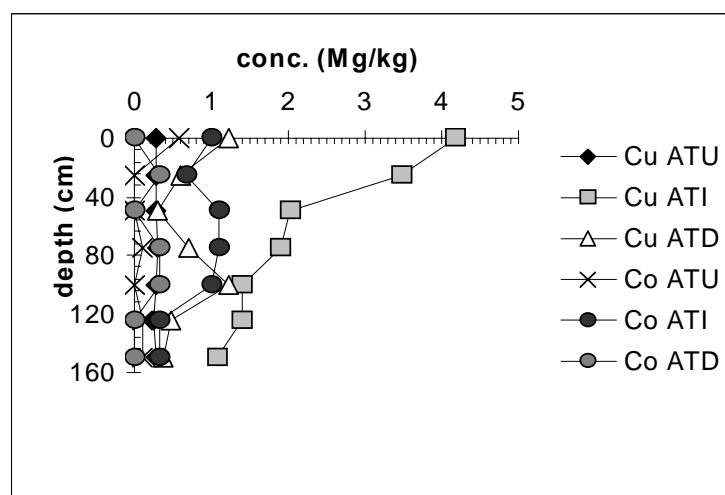


Figure 4. Behavior of Cu and Co along different Soil Profiles of Ampar Tenang open-tipping site

According to Elzahabi and Yong (2001), the solubility of heavy metals is highly pH dependent and increases with decrease in the soil pH. In the present work, the very acidic soil pH which enhanced the solubility of the contaminants eased the mobility of heavy metals spatially and vertically. However, the contamination present in the solid waste exerted a significant impact on the underlying soil but it has to be stressed that different metals behaved differently. The first layer of the soil i.e. near the ground surface (Figures 4 to 6) efficiently retained some metals such Cr and Zn and to less extent Co and Ni. However, the occurrence of the groundwater table at the Ampar Tenang area at shallow depths (i.e. 6.41 m to \approx 10 m above the sea level at BH1 and

BH3 respectively) which fluctuates very close to the ground surface during the rainy season supported the assumption of washing these metals into the groundwater. Furthermore, even during the dry season the insignificant drop of the groundwater table to some 0.5 m can highlight the short-distance pathway needed for these migrating elements to be released into the groundwater zone. In turn, this phenomenon can efficiently minimize the effect of natural attenuation of these elements by the clay minerals of the local soil material because even the partially attenuated elements near the ground surface can easily be washed during the periodical fluctuations of the groundwater table.

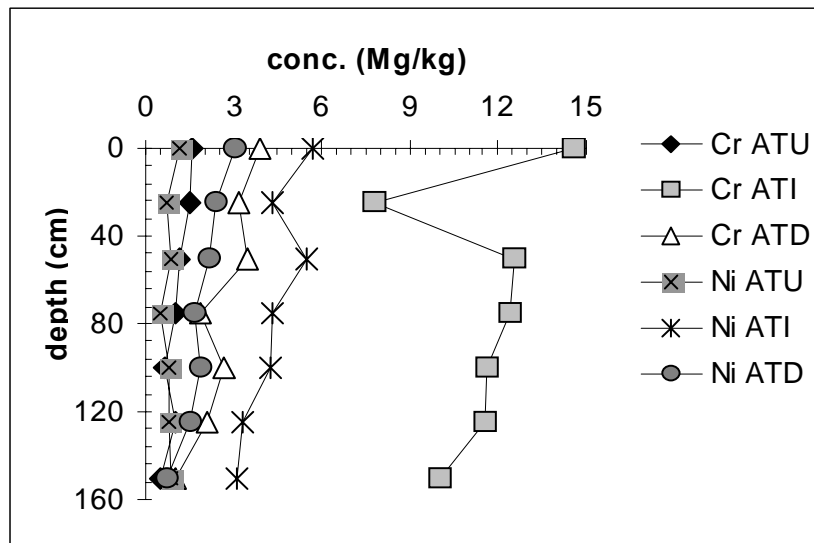


Figure 5. Behavior of Cr and Ni along different Soil Profiles of Ampar open-tipping site

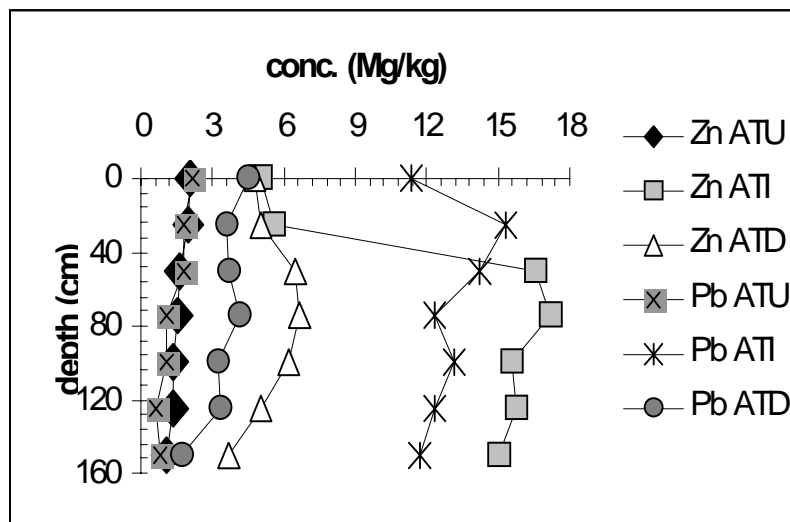


Figure 6. Behavior of Zn and Pb along different Soil Profiles of Ampar Tenang open-tipping site

With exception of Pb in ATI soil and Zn in ATD soil, which exhibited lower concentration levels in the upper 30 cm, almost all of the examined metals throughout the study area showed a notable decrease in the concentration below the depth 60 cm. The observed tendency to decrease with depth increase was related mainly to the flushing of these metals into the groundwater due to the mechanism of water table fluctuation. This mechanism was supposed to cause occasionally a considerable contaminants release into groundwater in the vicinity of Ampar Tenang open-tipping site. Furthermore, the acidic pH of soil could facilitate migration of these metals towards the

groundwater zone. The preliminary results of groundwater analysis assert this interpretation. Apart from this, the elevated concentration of these metals in ATD can be attributed to the movement of leachate plume downward of the site toe; however, the possible contribution from the use of chemical fertilizers also needs to be considered.

In general, the concentration levels of all analyzed heavy metals in the soil at the study area were found to be below the target limits determined by DoE (1997).

5. Conclusion

Soils of Ampar Tenang open-tipping site were extensively investigated in terms of concentration and vertical migration of selected heavy metals. Since the waste was disposed directly onto an unlined natural formation, a number of contaminants including heavy metals readily penetrated efficiently through the soil and eventually reached the groundwater. The short pathway needed for these contaminants before releasing into the groundwater besides, the periodical water table fluctuations can possibly minimize the effect of natural attenuation of these heavy metals by the soil material. It was found that soils from ATI locations were highly contaminated by heavy metals due to the impact of leachate seepage through the underlying soils. The acidic soil environment besides local groundwater flow directions availed the mobility of these metals spatially and vertically in the vicinity of the pollution source at Ampar Tenang site. In addition, the heavy metals present in the contaminated soils can be remobilized from the soil as a result of enhanced groundwater levels; therefore their replacement before constructing an impermeable barrier is highly recommended. The results of groundwater chemical analysis indicate a heavy contamination load by various types of contaminants including heavy metals e.g. lead (Pb) and copper (Cu).

6. Acknowledgements

This work was financially supported by the Ministry of Science and Technology of Malaysia through an IRPA Project No. 08-02-02-0008- EA 178.

7. References

Ahel, M., Nevevka, M., Bozena, C., Prohic, E., Vesna, S., 1998. The impact of contamination from municipal solid waste landfill (Zagreb, Croatia) on underlying soil. *Wat. Sci. & Tech.* **37** (8), 203-210.

Bosch, J.H. 1988. The Quaternary Deposits in the coastal plains of Peninsular Malaysia. Report # QC/1. Geological Survey of Malaysia.

Ding, A., Zhang, Z., Fu, J., Cheng L., 2001. Biological control of leachate from municipal landfills. *Chemosphere* **44** (1), 1-8.

DoE. 1997. Environmental Impact Assessment Guidelines For Groundwater and/or Surface Water Supply Project. Department of Environment of Malaysia Putra Jaya, Malaysia.

Elzahabi, M., Yong, R.N., 2001. pH influence on sorption characteristics of heavy invadoses zone. *Eng. Geo.* **60**, 61-68.

Erses, A.S., Onay, T., 2003. In situ heavy metals attenuation in landfills under methanogenic conditions. *Journal of Hazardous Materials.* **B99**, 159-175.

ISO 10390., 1994. Soil Quality-Determination of pH. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 5p.

Lamthoth, P.J., Fries, T.L., Consul, J.J., 1986. Evaluation of a Microwave Oven System for the dissolution of geologic samples. *Anal. Chem.* **53**, 1886-1887.

Martens D., Balta-Brouma K., Brotsack R., Michalke B., Schrame P., Klimm C., Henkelmann B., Oxynos, K., Schramm K., Diamadopoulos E., Kettrup, A., 1998. Chemical impacts of uncontrolled solid waste combustion to the vicinity of the Kourouptos Ravine, Crete, Greece. *Chemosphere*, **36** (14), 2855-2866.

Minerals and Geosciences Department of Malaysia. 2001. The study on sustainable groundwater resources and environmental management for Langat Basin in Malaysia., Interim Report # 1, in association of Japan International Cooperation Agency (JICA).

Omar, C.R., Jaafar, R., Hassan, H., 1999. Engineering geology and earthwork problem associated with highway construction in soft soil as Sg. Rasau, Dengkil, Selangor. *Geol. Soc. Malaysia Bull.* **45**, 174-186.

U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Standard operating procedures: Soil Sampling. SOP 2012-02/18/00.



Perilaku Peralihan Fasa Gegala (Pitch) Karbon Mesomorfik

Bambang Ariwahjoedi

Departemen Kimia FMIPA ITB
Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia
Tel. +62 22 250 2103 Fax. +62 22 250 4154 e-mail: ari@chem.itb.ac.id

Abstrak

Perilaku mesofasa karbon pada gegala diperrumit oleh adanya kereaktifan kimia pada temperatur pengamatan serta oleh lebarnya rentang dari struktur molekul spesi-spesi yang berada dalam sistem gegala itu. Sementara kompleksitas ini menyarankan penggunaan aluran transformasi waktu/tempartur, pertimbangan perilaku fasa hipotetis dari gegala yang mengandaikan tidak adanya perubahan komposisi keseluruhan dengan waktu telah cukup membantu dalam interpretasi gejala termal yang diamati. Dalam makalah ini diusulkan dan dijelaskan konstruksi suatu diagram fasa yang dapat secara lebih umum dipakai dalam interpretasi maupun prediksi peralihan mesomorfik dalam sistem gegala karbon.

Paper is on page 1131

Development of dyeless pH optode based on poly-o-toluidin films

B. Kuswandi^{1)*}, E. Agustina¹⁾, A.A Gani¹⁾ and E. Asijati²⁾

¹⁾Department of Chemistry, and School of Pharmacy, University of Jember, Jember 68121 Indonesia
e-mail: b_kuswandi@yahoo.co.uk

²⁾Department of Chemistry, University of Indonesia, Depok, Indonesia

Abstract

Poly-o-toluidin (POT), substituted derivative of polyanilin is viable materials for use in development of optical pH sensing. Thin films of POT readily deposit on polystyrene sheets, when o-toluidin is chemically polymerised in hydrochloride acid solution. The films have been characterised by absorption spectra in visible region between 400-800 nm. They undergo pH-dependent changes in their absorption spectra in the physiological pH range. The main advantageous of these pH sensors are that no indicator dye is needed because the POT films itself acts as both matrix and the indicator, compatible with solid state instrument, and easily be prepared.

Keywords: *pH sensor; Poly-o-toluidin film; Optode; Chemical polymerisation*

1. Introduction

Recently, measurements of pH using pH electrodes are sufficient for most kinds of application. However, a number of optical sensors for pH with different chemical transducers and optical principles have been described as well. This is due to the fact that such pH optodes can offer advantages in terms of size, electrical safety, costs, and there is no need for a reference element. Most sensors of this type are based on spectrometric determinations in the visible-near IR region (Gopel et al., 1991; Wolfbeis and Li, 1993; Sellien et al., 1992; Kuswandi and Narayanaswamy, 1999). Usually, the optodes employ a reagent dye or indicator that should be immobilised onto a solid support material. This type of optode poses three main problems: firstly, the reagent dye should retain its optical properties after the immobilization process and secondly, it should not leach to the solution (Wolfbeis, 1991). Therefore, the development of such optodes has focused on the search for new materials which overcome these problems.

One alternative has been the development of optode based on conducting polymer. Some of these compounds, obtained after chemical polymerisation, display optical properties in the visible-near IR region which change with the chemical reaction (De Marcos et al., 1999). The polymer itself, therefore, acts as the matrix support and the indicator dye. Furthermore, if in an ideal organic sensing material the essential properties like high sensitivity, film forming ability and permeability to the analyte could be combined in a single polymeric compound, then no additives would be required. That way the layer thickness could be minimal, and due to the absence of any leaching effects long-time stability and reproducibility could be realized if the polymer is stable itself. Being an intrinsically pH-sensitive and film forming polymer, polyaniline (PANI) and its derivatives are an excellent candidate for the use in fabrication of pH optode in the visible-near IR detection.

PANI has been widely used as the base of electrochemical sensors because of its

straightforward preparation methods and its stability (Gottesfeld et al., 1987; Glarum and Marshall, 1987). Apart from these properties, it is known that after chemical polymerisation, aniline give rise to thin film of PANI deposited onto polyester support, with a pH dependent absorption spectrum in the visible region (Pringsheim, et al., 1997; De Marcos, et al., 2000), which exhibit different forms: emeraldine salt (protonated), which is green; emeraldine base (partially protonated), which is blue; and pernigraniline (deprotonate), purple. These forms are related to the pH of the solution and, what is more important, reversibility from protonated to the deprotonated form is easily achieved. The main advantage of these films is that they can be used to measure pH from the acid to the base range. This has been used for the construction of pH sensors in the near IR region (Grummt et al., 1997) as well as its substituted polyanilines (Pringsheim, et al., 1997).

At the present study, the substituted polyanilines, i.e. poly-o-toulidin (POT) has been prepared as uniform film of good quality on practically polystyrene support. Here, by changing the solvent used for casting and by selecting an appropriate oxidising agent as well optimised the oxidant/aniline ratio and their polymerisation times, one can obtain different types of conductive POT, whose spectra differ distinctly in the visible – near IR region. Therefore, the main goal of the present work was to verify the applicability of film POT as substituted polyaniline, for a dyeless pH optode. In particular, the following characteristics have been observed: linear range, sensitivity, reproducibility and reversibility, as well as long term stability.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

O-toulidin was obtained from Sigma and used as received. Iron(III) chloride hexahydrate and ammonium peroxodisulphate were obtained from BDH (PA grade). Solutions of these compounds were prepared by dissolving the corresponding quantity of the reagent in distilled water. Acetic acid solutions were prepared daily by dilution of the glacial acetic acid (BDH) in distilled water. The acetic acid concentration of solutions was obtained by acid-base titrimetry, if necessary.

A wide range buffer solution was prepared (Perrin & Dempsey, 1974) containing 0.1 M citric acid, 0.1 M potassium dihydrogenphosphate, 0.1 M sodium tetraborate, 0.1 M tris(hydroxymethyl)-aminomethane and 0.1 M potassium chloride, 50 ml of this solution was diluted to 200 ml with water, and 0.4 M sodium hydroxide or 0.4 M hydrochloride acid solution was used to adjust pH to desired value over the pH range 2-11.

2.2. Apparatus

Absorbance measurements were performed using an Hitachi spectrophotometer (U-1800) and a glass cuvette of 1 cm path length. The pH was monitored with a commercial glass electrode and a pH-meter (Hanna Instruments 9318) calibrated at the pH values of 4.00, 7.00 and 9.00. The pKa was calculated graphically, since titration plots deviate from the theoretical (Henderson-Hasselbach) shape.

2.3. Preparation of POT films

POT films were fabricated by polymerization in 15 ml glass beaker, where the base of such beaker glass has been covered with circle polystyrene sheet (6 cm in i.d.). To this end, typically 2 ml of 0.1 M ammonium peroxodisulphate, 0.1 ml of 1M hydrochloride acid and 75 μ l of pure o-toluidine (of various ratios oxidant/o-toluidin, see Table 1) were added and continuously stirred. After polymerisation for selected time (30, 60 and 90 mins, see Table 1), a thin film of POT was deposited on the polystyrene sheet. The polymerisation reaction was stopped by discharging the solution and washing the film POT deposited on the sheet with distilled water several times and stores the film in water at 4°C. Their Thickness was determined by interferometry to be between 80-100 nm, according to time of polymerisations. Though the film thickness was not routinely determined for all samples, since we may be conclude from their absorbance that the thickness was always in the same order of magnitude.

2.4. Measurement procedure

Variations of absorbance in the films were determined by placing the film (1x 5 cm) in glass cuvette, previously filled with the desired buffer (pH 2-11), and by measuring the absorbance changes at the desired wavelengths (wavelength where a wide linear range of pH has been observed). Although changes in

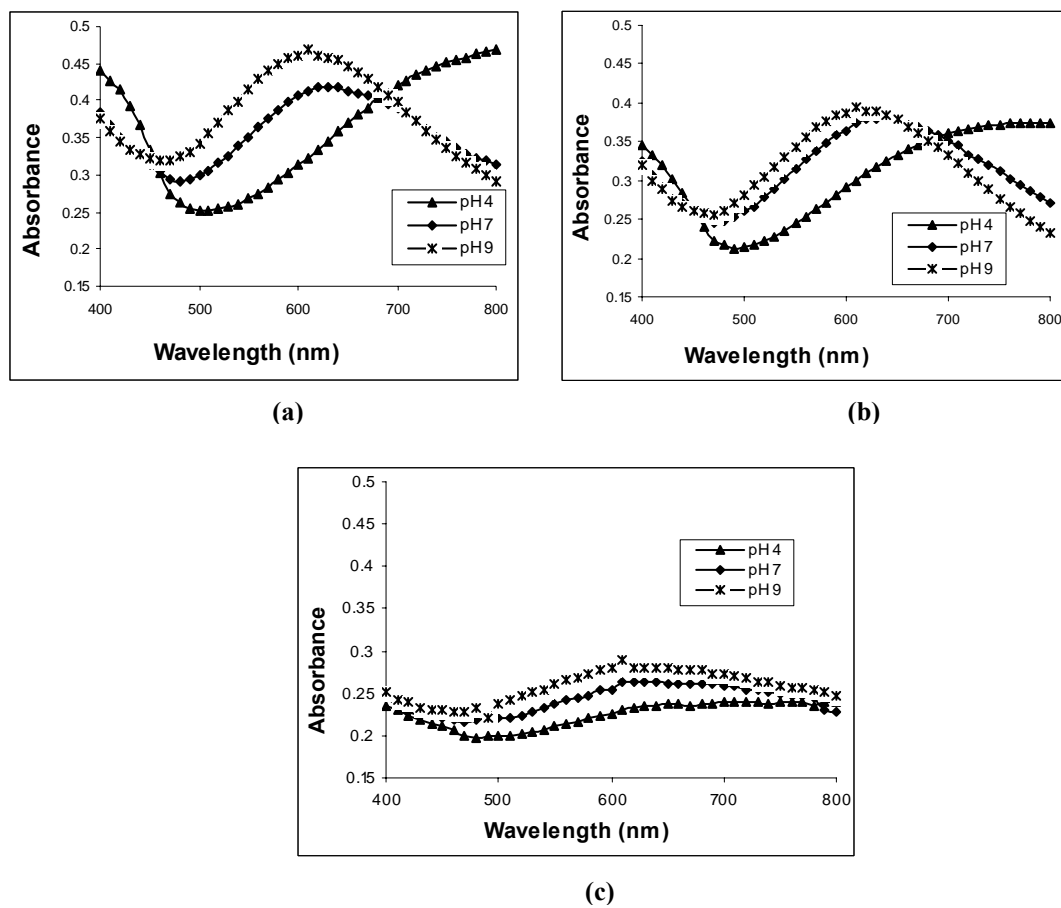


Figure 1. POT film spectra toward pH (4, 7 and 9) at various polymerisation time (a) 30'; (b) 60' dan (c) 90' with mol ratio (oxidant/monomer) 1.62.

absorbance occur within the first seconds, all data were collected 60 seconds later, in order to obtain reproducible and comparable measurements.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of polymerisation parameters

Some parameters which might improve the response of the POT film were studied. Among these parameters, it was observed that when iron(III) chloride was used as an oxidant, lower absorbances of the POT film were obtained than with peroxodisulphate. Furthermore, the film showed lower sensitivity toward variations of pH in term of absorbances in the visible reagent (400-800 nm). Therefore, according to this fact, ammonium peroxodisulphate was used as an oxidant for further POT film preparation.

The most important parameters to be considered for polymerisation are: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ concentration, polymerisation time and the

ratio of the oxidant/monomer concentration. As far as ammonium peroxodisulphate is concerned, the best results were obtained with a 0.1 M solution. With polymerisation times of up to 30 minutes, typically, uniform thin films are obtained with good transparency and show pH dependent. If polymerisation times more than 60 minutes, thicker films are obtained with low transparency (probably due to different polymer composition and multilayer formed), which in turn, in lowering their absorbances and longer response times toward pH (4, 7 and 9) (Fig. 1). Therefore, polymerisation times of 30 minutes was selected for further polymerisation time.

With regard to the oxidant/o-toluidine ratio, all measurements were carried out with a 1M solution of ammonium peroxodisulphate, o-toluidine (as purchased) and different volume of each solution. Figure 2 show variation of the absorbance spectral with pH at different oxidant/monomer ratio at visible wavelength (400-800 nm). As can be seen, that the mol

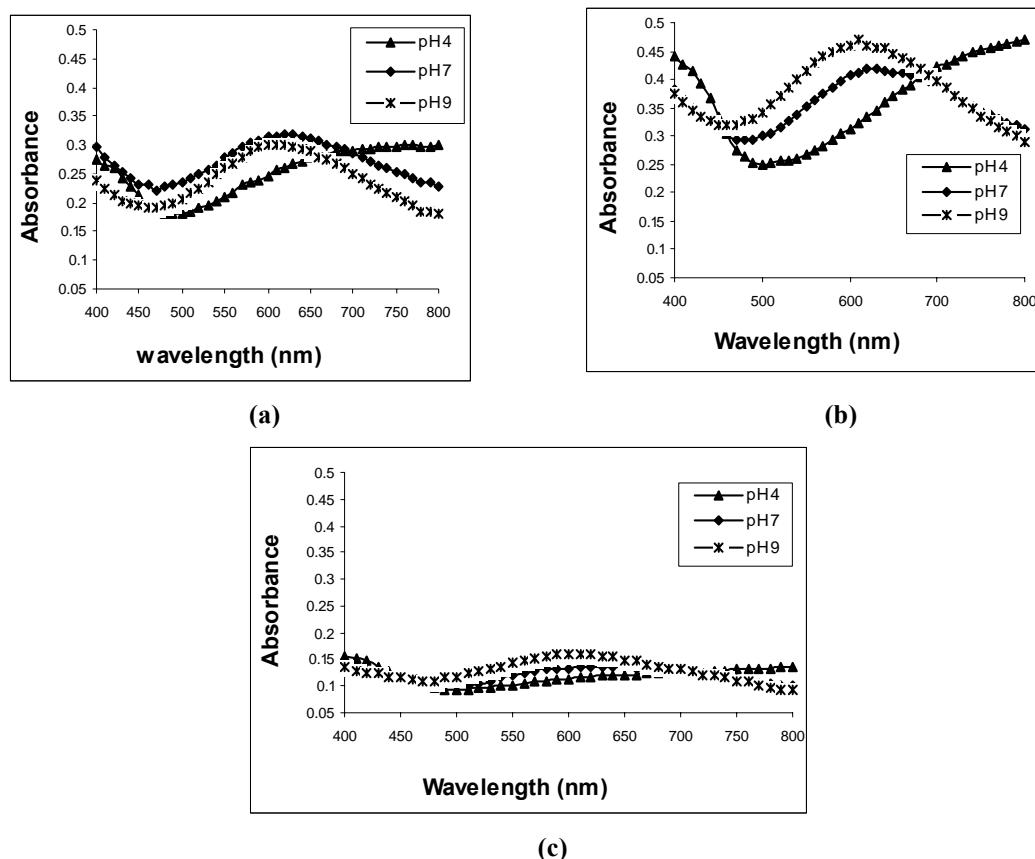


Figure 2. Film POT spectral in various mol ratio (oxidant/monomer) (a) 1,08; (b) 1,62 dan (c) 2,16 with polymerisation time 60 minutes

ratio of 1.62 show more pH dependence significantly than other ratio (1.08 and 2.16). Therefore, ratio of 1.62 at polymerisation time 30 minutes was used for further film fabrication. The polymerisation time observed for POT film in agreement as reported for PANI film (Stejskal and Gilbert, 2002).

3.2. Spectral characteristic of POT film toward pH

Visible spectrums of the POT films (ratio 1.62 and polymerization time 30 minutes) were acquired over the 400-800 nm at pH 2-11 (Fig 3). The spectrum is highly pH dependent; the change on going from the dark blue emeraldine base to the green protonated form is shown in Fig. 3, where increasing the pH from 2 to 11 lead to shift in the absorption maximum of film POT from 800 (at pH 2) to 600 nm (at pH 11). In acidic solutions, POT film is green but changes to blue in neutral and dark blue in basic solutions. The pH dependence of the maximum wavelength at 600 to 800 nm, are plotted in Fig. 4, where the wavelength of the maximums in fact change with pH according to

a slightly sigmoidal curve. The results really point to a more complicated reversible structural transition than the mere loss or gain of proton in the molecule. These results are in agreement with PANI film as reported previously (De Marcos et al., 2000).

In order to show the broader linear response of the POT film toward pH (2-11). The selected wavelength at 800 nm has been used for calibration of the POT films, as shown in Fig. 5, with correlation coefficients (R^2) 0.9844. Through the slope of the curve at Fig. 5, it can be stated that the sensitivity of the curve is 0.0314. Here, the change in 1 pH unit only resulted the absorbance change at 0.0314, which is still low compared to the pH electrode.

The apparent pKa value of POT film (7.20) is in the physiological range. In general, titration curves of monobasic acid have a sigmoidal shape which can be expressed by the Henderson-Hasselbach equation. However, the titration curves of PANI films are much broader than predicted by this equation, and the

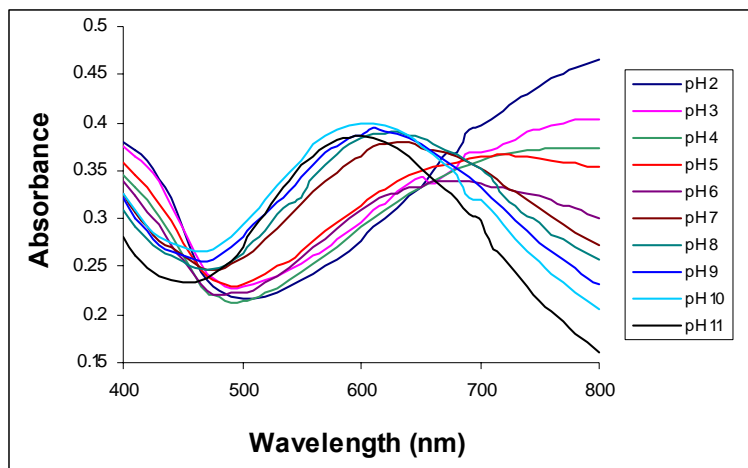


Figure 3. Visible spectra of POT film towards pH 2-11.

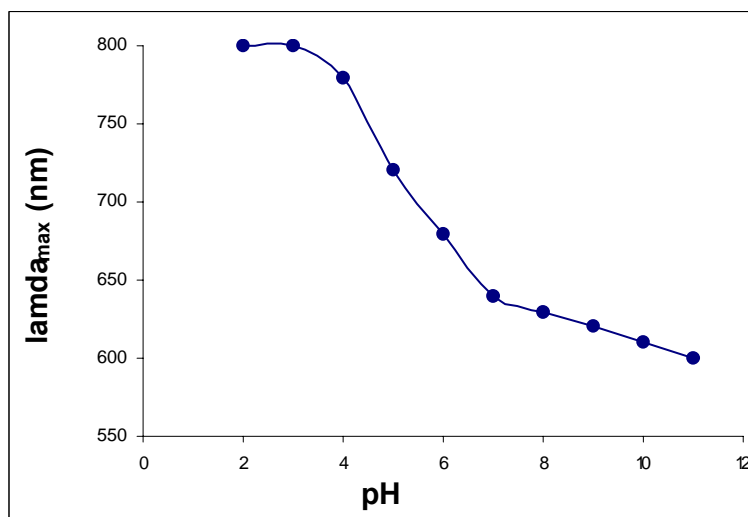


Figure 4. The maximum wavelength (λ_{max}) vs pH of the POT.

pH dependence of the films occurs over a much wider pH range. Here, the dynamic range (the absorbance change at 800 nm) is from pH 2 to 11 (Fig. 5). Obviously, the Henderson-Hasselbach equation is not valid for POT films, and the pKa values given are apparent values, probably the average of several species of variable chain length and composed of different structural moieties.

3.3. Reproducibility and stability

To study the reproducibility of its response, a POT film was exposed to solutions of different pH up to 50 times. Typically, a spectrum was taken first buffer of pH 2. After washing with distilled water, the second measurement was performed in buffer of pH 3, followed by measurements in buffer of pH 4 up to pH 11. Films were washed between each measurement

with distilled water. The reproducibility is satisfactory enough, since the absorbance varies by around 0.004-0.013 only or less than 5% (RSD=4.88%). Thorough inspection of the data shows that there are always some minor drifts of the absorbance observable. The drift amounts to well below three percent of the highest absorbance per day under condition of experiment. Nevertheless, it should be underlined that due to the hysteresis it is necessary to preconditioned the film before each measurement. POT films are stable in water even for months. Exposure to air over long period (1 day), however, causes the films undergo a color change from green to slightly yellow. These films were no longer show a pH dependence of the absorption spectra.

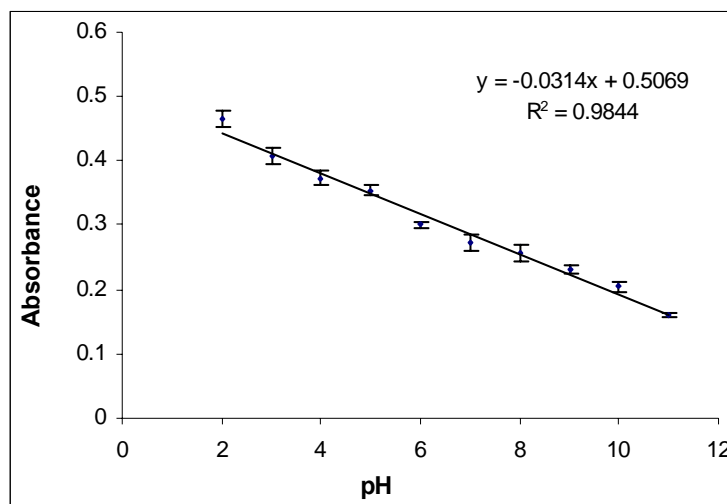


Figure 5. Calibration curve of POT film toward pH 2-11.

Table 1. Comparison of tap water pH with commercial pH meter and film PANI (n=5)

Sample	pH meter	PANI films
Tap water	6.96 ± 0.02	6.78 ± 0.2

3.4. Interferences

Both oxidants and reductants do interfere POT films, as can readily be derived from the well known electrochemical data (Quillard, et al., 1995). For instance, potassium chromate (1 mM) and sodium nitrite (1 mM) at pH 3 changes the absorbance spectrum. Furthermore, ascorbic acid (1 mM), sodium disulfide (1 mM) and hydrogen sulfide (1 mM) cause change in the absorption spectrum. However, no spectral change were observed with Ni(II), Co(II), Cu(II) and Zn(II) (each 1 mM at pH = 4.0). The metal ion concentrations were arbitrary chosen and need not represent upper limits for the absence of any cross sensitivity. An influence of the ionic strength was negligible up to a concentration of 0.1 M potassium chloride.

3.5. Application

As previously established when working at wavelength 800 nm, a linear range (at pH 2-11) was obtained. The precision in the pH measurement established as the RSD for a solution of pH 4 was 4.35 % (n=5). POT films were used to measure pH in tap water. Table 1 shows the results, which are in agreement to those obtained with commercial pH meter. After, a t-test was applied to the result obtained with POT films and pH meter, no significant difference was observed (95%).

4. Conclusions

The chemically-polymerised POT films display a pH-dependent spectrum in the visible range, which makes the films useful to design pH optode, since the films are compatible with LEDs and diode-laser exciting sources. Sensor film preparation is significantly easier in comparison to layer consisting of sensitive dyes in organic polymer cocktail. Due to the hysteresis effect conditioning of the film is required before any measurement, simply by immersing in 0.1 M HCl followed by distilled water.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (KMNRT) of Indonesia within project RUT XI, which is gratefully acknowledged.

6. References

- De Marcos, S., Hortiguera, R., Galban, J., Castillo, J.R., Wolfbeis, O.S., *Microchim. Acta.*, 130 (1999) 267.
- De Marcos, S., Asensio, C., Urnuela, I., Gallarta, F., Galban, F., Castillo, J.R., *Quim. Anal.*, 19 (2000) 99.
- Gopel, W., Hesse, J., Zemel, *Optochemical Sensors. A Comprehensive Survey*, VCH, Weinheim Germany (1991).

B. Kuswandi, E. Agustina, A.A Gani and E. Asijati

- Gottesfeld, S., Redondo, A. Feldberg, S.W., *J. Electrochem. Soc.*, 134 (1987) 271.
- Glarum, S.H., Marshall, J.H., *J. Electrochem. Soc.*, 134 (1987) 142.
- Grummt, U.W., Pron, A., Zagorska, M., Lefrant, S., *Anal. Chim. Acta.*, 357 (1997) 253.
- Kuswandi, B., Narayanaswamy, R., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 605.
- Pringsheim, E., Terpetschnig, E., Wolfbeis, O. S., *Anal. Chim. Acta*, 357 (1997) 247.
- Perrin, D.D., Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and Hall, London. 1974, pp. 48-49.
- Quillard, S., Berrada, K., Louarn, G., Lefrant, S., Lapowski, M., Pro, A., *New J. Chem.*, 19 (1995) 365.
- Sellien, W., Czolk, R. Reichert, J., Ache, H.J., *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 83.
- Stejskal, J., Gilbert, R.G., *Pure Appl. Chem.*, 74, (2002) 857.
- Wolfbeis, O.S. *Fibre optic chemical sensors and biosensors*, Vols. 1 and 2, CRC Press, Boca Raton, Florida. (1991) Pp. 359-384.
- Wolfbeis, O.S., Li, H., *Biosens and Bioelectron.*, 8 (1993) 161.

Pemanfaatan Zeolit Alam Sebagai Fasa Diam Kromatografi Lapis Tipis Pada Pemisahan Hasil Ekstraksi Tar Batubara Dengan Pelarut Piridin Dan n-Heksana

Bambang Setiaji, Sri Sudiono, Sura Menda Ginting

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

Abstract

Utilization of zeolite as stationary phase in thin layer chromatography for separation of coal tar extraction using pyridin and n-hexane, as solvent, have been done. Coal tar was produced by pyrolysis of coal in temperature 700^oC with the flow of N₂ gases is 100 ml/minute and the increase of the heat is 30^o/minute. Pyrolysis done by varying the time from 2 until 4,5 hours to find the optimum of product.

The extraction of coal tar was done by using pyridin as solvent with the ratio of tar and pyridin was 1:2, continued with extraction using n-hexane with ratio of tar and n-hexane was 1:2. n-Hexane extract was separated using natural zeolite as stationary phase in thin layer chromatography with eluent of n-hexane: acetone in ratio 3:1.

The result of the research was, the optimum product of pyrolysis in 3 hours with conversion is 26,70%. Extraction of coal tar showed that pyridin solved almost all of the coal tar compounds, instead n-hexane solved only a few of them. From the peak of TLC chromatogram of n-hexane extract using zeolite as stationary phase, found that the best separation was showed by Mn-zeolite, followed by active, calcinate zeolite and silica gel.

Keywords : coal tar, extraction, thin layer chromatography

1. Pendahuluan

Mineral zeolit banyak ditemukan dalam batuan vulkanik dan dalam batuan sedimen serta batuan metamorfosa yang membentuk zeolit karena pengaruh pemanasan dan pendinginan. Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki banyak gunung berapi, sehingga Indonesia dikenal sebagai penghasil zeolit yang potensial.

Selama ini zeolit telah banyak digunakan sebagai adsorben dan penukar ion dalam proses penjernihan air. Umumnya, zeolit dibuat dalam bentuk *molecular sieves* untuk pemisahan molekul berdasarkan bentuk dan ukuran yang berbeda. Penggunaan lain dari zeolit yaitu sebagai katalis dalam industri-industri besar, karena kemampuan aktifitas dan selektifitas yang tinggi (Smart dkk, 2001, Rachmat 2001). Sebagai contoh, zeolit mempunyai peranan yang penting dalam proses industri di Pertamina dan industri petrokimia yang umumnya banyak menggunakan proses perengkahan dan isomerisasi hidrokarbon

(Augustine, 1990; Suyati, 2000).

Zeolit merupakan senyawa kristal dari silika alumina yang berpori. Pembentuk zeolit adalah kerangka tetrahedral dengan 4 anion atom oksigen yang mengelilingi sebuah atom silika atau alumina. Masing-masing ion silika mempunyai muatan +4 berkesetimbangan dengan 4 atom oksigen, sehingga muatan tetrahedral silika menjadi netral, sedangkan untuk struktur tetrahedral alumina akan bermuatan -1. Muatan negatif satu ini akan dinetralkan oleh kation-kation logam atau atom hidrogen (Gates, 1979; Max Lu, 2000).

Sebagaimana telah diketahui, silika sebagai salah satu jenis senyawa berpori telah banyak digunakan secara luas dalam berbagai proses kimia, salah satunya adalah sebagai fasa diam dalam proses pemisahan kromatografi lapis tipis (KLT). Berdasarkan strukturnya yang berpori dan kesamaan sifat antara silika dengan zeolit, maka diharapkan zeolit dapat bertindak sebagai fasa diam dalam proses pemisahan komponen-komponen kimia lewat proses

kromatografi lapis tipis.

Tar batubara merupakan hasil samping dari proses pirolisis batubara jenis lignit yang merupakan batubara muda. Batubara jenis ini mempunyai kelimpahan yang paling banyak di Indonesia. Kondisi ini cukup disayangkan mengingat batubara jenis lignit mempunyai nilai jual yang rendah karena nilai kalor pembakaran yang dihasilkan oleh batubara jenis ini relatif kecil (Touchstone, 1992). Hal ini disebabkan oleh kadar air yang cukup tinggi, sehingga dalam proses pembakarannya dihasilkan produk samping yang biasanya tidak diinginkan.

Proses pirolisis batubara akan menghasilkan batubara dengan kualitas yang lebih baik, sedangkan tar batubara sebagai hasil sampingannya, memiliki kandungan hidrokarbon dalam bentuk aromatis, alifatik dan juga senyawa-senyawa heteroatom lainnya. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam tar batubara ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri kimia (Poole et.al, 1991)

Penelitian yang dilakukan memanfaatkan tar batubara sebagai bahan dasar yang komponen-komponennya akan dipisahkan. Senyawa yang dapat diisolasi dari komponen tar batubara adalah hidrokarbon alifatik baik rantai lurus maupun rantai bercabang yang merupakan fraksi minyak (Hessley dkk., 1986). Untuk mengisolasi hidrokarbon fraksi ini, maka digunakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang sesuai, salah satunya adalah n-heksana

2. Percobaan

Batubara lignit dengan ukuran 325 mesh dan dijadikan sebagai umpan dalam proses pirolisis, yaitu sebanyak 1325 gr dimasukkan ke dalam reaktor.. Pirolisis tahap pertama dilakukan dari temperatur kamar hingga temperatur reaktor mencapai 400°C. Kemudian temperatur dinaikkan sampai dengan 700°C, kemudian temperatur reaktor diturunkan secara perlahan. Setelah tidak ada lagi gas yang keluar dari reaktor, proses pirolisis dihentikan. Hasil pirolisis berupa gas ditampung dalam wadah dan didinginkan dalam air es. Produk yang diperoleh berupa tar batubara yang akan digunakan dalam proses selanjutnya.

Tar batubara dilarutkan dalam pelarut piridin dengan perbandingan 1:1 (v/v),

kemudian diaduk selama 1 jam. Larutan tar ini kemudian diekstraksi dengan menggunakan n-heksana dengan perbandingan 1:2 (v/v) selama 5 jam. Lapisan n-heksana dipisahkan dengan corong pisah dan pelarutnya diuapkan. Hasil ekstraksi ini kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis.

Zeolit sebagai penyerap pada KLT

Zeolit dengan ukuran 325 mesh dipanaskan dalam oven sampai dengan temperaturnya mencapai 600°C selama kurang lebih 2 jam. Kemudian dicampur dengan akuades untuk membuat bubur zeolit dengan perbandingan berat zeolit : volume akuades sebanyak 5:6 (g/mL). Pembuatan lapisan tipis dilakukan dengan cara membentangkan bubur zeolit pada plat kaca dengan ketebalan 0,25 mm menggunakan alat pembentang KLT. Plat KLT yang telah jadi kemudian dikeringkan dan dioven pada temperatur 100°C untuk menguapkan airnya.

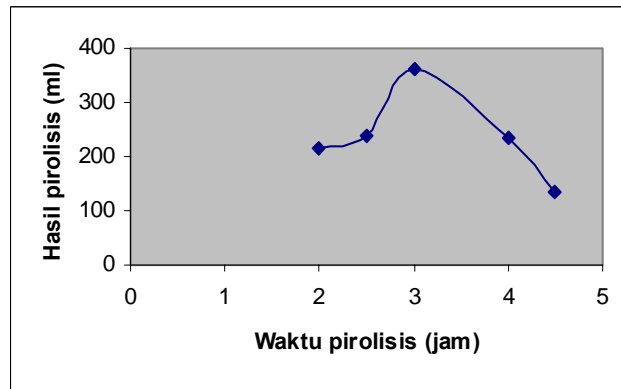
Proses pengembangan dilakukan dengan cara memplotkan cuplikan (tar batubara yang dilarutkan dalam piridin dan hasil ekstraksi dengan n-heksana) pada plat KLT pada jarak kira-kira 1 cm dari bagian bawah kaca. Lapisan tipis yang mengandung cuplikan dimasukkan dalam bejana pengembang yang berisi fasa gerak berupa n-heksana dan aseton dengan perbandingan 3:1 (v/v). Proses pengembangan untuk semua jenis penyerap (ZAA, ZAK, Mn-Zeolit dan silika gel) dilakukan secara bersamaan. Hasil pengembangan dianalisis dengan *scanner TLC* pada panjang gelombang yang sesuai. Penentuan panjang gelombang maksimum ditentukan pada kisaran 200-500 nm.

3. Hasil Dan Pembahasan

Pirolisis Batubara

Proses pirolisis batubara menghasilkan cairan kental berupa tar batubara yang terdiri dari dua lapisan. Lapisan atas berwarna kehitaman dan mempunyai berat jenis sebesar 0,9963 g/mL sedangkan lapisan bawah berupa cairan yang lebih encer berwarna kecoklatan dengan berat jenis sebesar 0,9964 g/mL.

Pirolisis batubara dilakukan dengan memvariasikan waktu pirolisis untuk melihat pengaruhnya terhadap banyaknya tar yang dihasilkan. Dibuat grafik antara hasil pirolisis



Gambar 1. Hubungan antara lama pirolisis dengan banyaknya tar yang dihasilkan

dan lamanya pirolisis dan didapat data seperti gambar 1.

Dari gambar 1 dapat dilihat bahwa waktu optimum pirolisis batubara adalah pada 3 jam, karena pirolisis dengan waktu lebih lama akan menghasilkan penurunan jumlah tar yang diperoleh.

Ekstraksi Tar Batubara

Tar batubara yang diperoleh dalam penelitian ini dilarutkan dengan piridin yang kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan n-heksana.

Dari tabel 1 terlihat bahwa pada tar awal yang terdiri dari dua lapisan menjadi satu lapisan ketika diekstraksi dengan piridin, ini

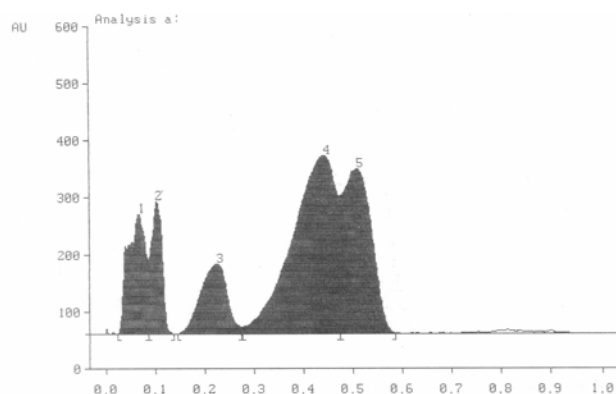
menunjukkan bahwa piridin melarutkan semua komponen dalam batubara. Akan tetapi ketika diekstraksi dengan n-heksana terbentuk kembali dua lapisan yang menunjukkan bahwa n-heksana hanya melarutkan sebagian dari komponen yang terlarut dalam piridin.

Hasil ekstraksi dari tar batubara dengan pelarut piridin dilanjutkan dengan pelarut n-heksana dapat dibandingkan dengan tar batubara awal dengan melihat kromatogram KLT pada gambar 2.

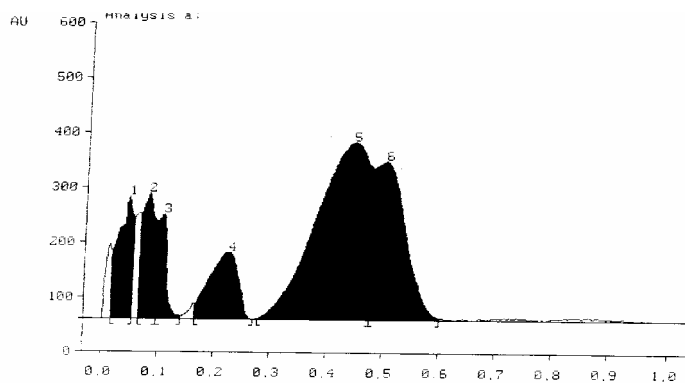
Kemampuan piridin melarutkan tar batubara dilihat dengan membandingkan kromatogram KLT dari ekstrak piridin dengan tar batubara yang terdapat pada gambar 3.

Tabel 1. Perbandingan tar awal dengan ekstraksi dengan piridin dan n-heksana

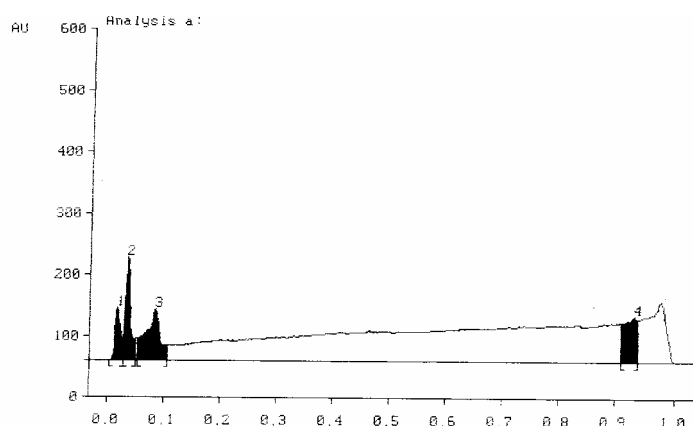
Tar awal	Ekstraksi dengan piridin	Ekstraksi dengan n-heksana
Terdiri dari dua fasa	Terdiri dari satu fasa	Terdiri dari dua fasa
Lapisan atas keco-klatan dan lapisan bawah lebih bening	Berwarna coklat kehi-taman	Lapisan atas kuning bening dan lapisan bawah lebih kuning
Berbau tajam	Berbau lebih tajam	Berbau lebih lembut



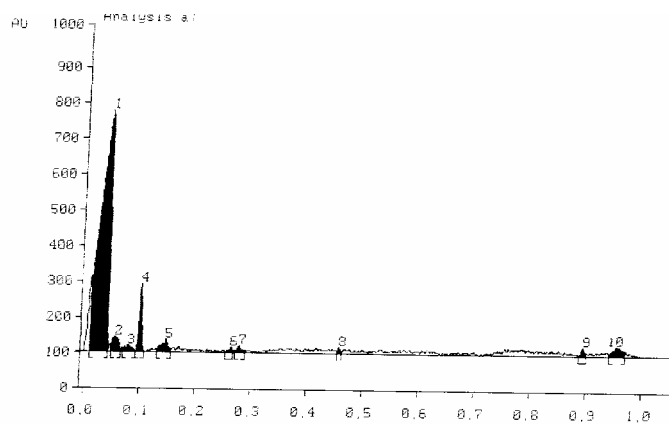
Gambar 2. Kromatogram KLT hasil ekstraksi tar batubara dengan pelarut piridin dengan plat silika gel



Gambar 3. Kromatogram KLT tar batubara awal dengan plat silika gel



Gambar 4. Kromatogram KLT ekstrak n-heksan dengan plat silika gel



Gambar 5. Kromatogram KLT ekstrak n-heksana dengan plat ZAA

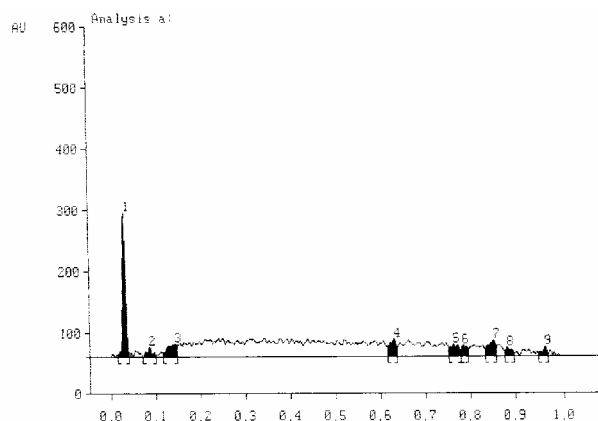
Dari kedua kromatogram (gambar 2 dan 3) terlihat bahwa piridin melarutkan hampir semua komponen batubara.

Tahap berikutnya merupakan tahap ekstraksi dengan menggunakan n-heksana

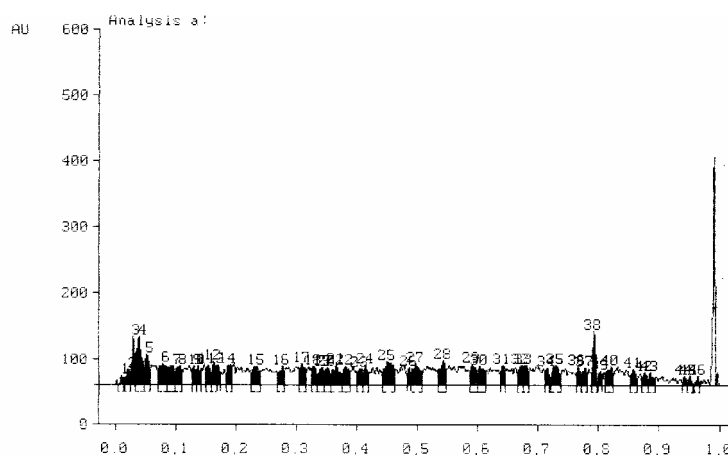
Dari hasil analisis melalui KLT terlihat adanya pemisahan komponen-komponen dari ekstrak n-heksana. Komponen dengan harga Rf yang besar merupakan komponen alifatis dan non-

polar. Ekstraksi dengan menggunakan n-heksana menunjukkan pengurangan jumlah komponen yang cukup signifikan jika dibandingkan dengan ekstrak piridin dan terlihat bahwa ekstrak n-heksana melarutkan komponen yang bersifat non-polar.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa pelarut piridin melarutkan hampir semua komponen tar batubara, sedangkan pelarut n-



Gambar 6. Kromatogram KLT ekstrak n-heksana dengan plat ZAK



Gambar 7. Kromatogram KLT ekstrak n-heksana dengan plat Mn-zeolit

heksana melarutkan komponen yang lebih bersifat non-polar.

Zeolit alam aktif sebagai adsorben KLT

Pemisahan ekstrak n-heksana dengan zeolit alam aktif sebagai fasa diam pada kromatografi lapis tipis terlihat pada gambar 5.

Pada pemisahan KLT dengan menggunakan zeolit alam aktif ini terlihat bahwa komponen tar batubara yang terekstrak oleh pelarut n-heksana lebih menyukai fasa diamnya karena komponen dengan harga Rf relatif paling kecil mempunyai intensitas paling besar. Afinitas komponen terlarut dalam n-heksana dengan zeolit alam aktif disebabkan karena adanya kesesuaian antara ukuran pori zeolit dengan molekul senyawa dalam komponen tersebut.

Zeolit alam terkalsinasi sebagai adsorben KLT

Pemisahan senyawa hasil ekstraksi tar batubara dengan pelarut n-heksana menggunakan zeolit alam terkalsinasi terlihat pada kromatogram gambar 6.

Pemisahan KLT dengan menggunakan zeolit alam terkalsinasi sebagai fasa diam menghasilkan sembilan puncak kromatogram.. Pada pemisahan dengan zeolit alam terkalsinasi dapat diketahui bahwa persentase dari komponen yang terserap pada fasa diam berkurang, dibandingkan dengan zeolit alam aktif, yang berarti bahwa afinitas sampel berkurang terhadap fasa diamnya.

Mn-zeolit sebagai adsorben KLT

Dengan menggunakan Mn-zeolit sebagai fasa diam KLT pada pemisahan hasil ekstraksi tar batubara dengan pelarut n-heksana, diperoleh kromatogram seperti terlihat pada gambar 7.

Pemisahan dengan menggunakan Mn-zeolit menghasilkan kromatogram dengan jumlah puncak sebanyak 46 puncak.. Pemisahan dengan plat Mn-zeolit menunjukkan bahwa tiap-tiap komponen dalam ekstrak n-heksana mempunyai afinitas yang berbeda-beda terhadap Mn-zeolit. Untuk senyawa yang mempunyai ukuran yang lebih kecil dibanding ukuran pori Mn-zeolit akan terbawa oleh eluen,

sehingga harga Rf-nya besar, sedangkan yang ukurannya lebih besar dari pori Mn-zeolit akan tinggal dan harga Rf-nya kecil. Mn-zeolit memiliki luas permukaan spesifik paling besar di antara ketiga jenis zeolit yang digunakan. Hal ini disebabkan karena Mn-zeolit mempunyai ukuran volume paling besar diantara ketiganya

Pada pemisahan dengan menggunakan zeolit sebagai fasa diam KLT, luas permukaan spesifik dari zeolit memberikan pengaruh yang besar. Makin besar luas permukaan zeolit, maka makin baik pemisahan yang dihasilkan karena makin besar luas permukaan akan memperbanyak situs aktif dari zeolit. Selain itu kesesuaian antara ukuran pori dengan ukuran molekul yang diserap juga turut mempengaruhi proses pemisahan pada KLT.

Dari banyaknya jumlah puncak kromatogram KLT dapat diketahui bahwa pemisahan hasil ekstraksi tar batubara dengan pelarut piridin dan n-heksana yang paling baik berturut-turut menggunakan zeolit adalah Mn-zeolit, Zeolit alam aktif dan zeolit terkalsinasi

4. Kesimpulan

Dari uraian pada hasil dan pembahasan dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Untuk mendapatkan hasil pirolisis yang terbanyak pada suhu pirolisis sampai dengan 700°C, maka lama pirolisis yang terbaik adalah pada 3 jam dengan hasil maksimum sebanyak 26,70% berat batubara awal.
2. Ekstraksi tar batubara dengan pelarut piridin melarutkan hampir semua komponen tar batubara, sedang pada kromatogram ekstrak n-heksana terlihat adanya pengurangan jumlah puncak yang menunjukkan bahwa, n-heksana hanya melarutkan sebagian dari komponen tar batubara.

3. Dari ekstrak n-heksana yang dielusikan pada variasi fasa diam dengan eluen n-heksana : aseton 3 :1 (v/v), terlihat jumlah puncak kromatogram KLT yang dihasilkan. Pemisahan yang baik berturut-turut menggunakan zeolit adalah Mn-zeolit, zeolit alam aktif dan zeolit terkalsinasi.

5. Daftar Pustaka

- Agustine, J.R., 1990, *Heterogeneous Catalysis for The Synthetic Chemist*, 1st Edition, Marcel Decker, Inc., New York
- Davies, C., A.I. Porter dan G.J. Rees, 1991, *The Effect of Heat on Coal, An Annotated Bibliografi, Speculation in Science and Technology*, Vol. 14, no 2-3
- Gates, B.C., J.R. Katzer dan G.C.A. Schuil, 1979, *Chemistry of Catalytic Processes*, 1th Edition, McGraw-Hill Book Company, New York
- G.Q. Max Lu, 2000, *Molecular Engineering of Nanoporous Materials for Superior Adsorbents and Catalysts*, Prosiding Seminar Nasional Kimia, Jurusan Kimia FMIPA UGM
- Hessley, R.K., John W.R. dan John T.R., 1986, *Coal Science An Introduction to Chemistry, Technology and Utilization*, John Wiley and Sons, New York
- Poole, C.F. dan Salwa K. Poole, 1991, *Chromatography Today*, Elsevier Science B.V. Netherland
- Rachmat, A., 2001, *Pengaruh Temperatur Pirolisis dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Terhadap Produk Cair Batubara*, Tesis S-2, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta
- Smart, L. dan Elaine M., 2001, *Solid State Chemistry (An Introduction)*, 2nd Edition, Nelson Thornes Ltd., UK
- Suyati, L., 2000, *Kinetika Reaksi Pirolisis Batubara dengan Menggunakan Katalis Nikel/Zeolit*, Tesis S-2, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta
- Touchstone, J.C., 1992, *Practise of Thin Layer Chromatography*, 3rd Edition, John Wiley and Sons, New York



Determination Of Aflatoxins B1, B2, G1 And G2 In Traditional Medicines Of South-East-Asian Countries

Bahrudin Saad¹⁾, Ikenna Alphonse Osi, Muhammad Idiris Saleh, Norziah Mohd Hani²⁾, Ahamad Abu³⁾, Noor Hasani Hashim³⁾, Norhayati Ali⁴⁾

1) School of Chemical Sciences, Universiti Sains Malaysia, e-mail: bahrud@usm.my

3) School of Industrial Technology, Universiti Sains Malaysia

4) National Poison Centre, Universiti Sains Malaysia

5) Chemistry Department Malaysia, Penang

Abstract

Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in traditional medicine preparations were determined using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)-spectrofluorimetry. The samples were first extracted with acetonitrile-water (9:1) and cleaned-up on a multifunctional solid phase extraction (IMC) column. The samples were pre-column derivatised using trifluoroacetic acid (TFA) to enhance the fluorescent intensities of B1 and G1 before their HPLC separation using a mobile phase of acetonitrile-methanol-water (10:20:70). Oily materials were removed prior to the HPLC injection by extracting them into hexane. Samples analysed included the popular after-birth medications jamu and makjun. Aflatoxins were not detected in any of the 35 samples analyzed. Average recoveries for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 for three different extracts spiked with 10 ppb each of B1 and G1 and 20 ppb each of B2 and G2 were 91.4, 92.9, 102.1 and 90.8 %, respectively. Analytical challenges in the analysis of these aflatoxins in food samples are discussed and highlighted.

Paper is not available

Tiosianat Dan Isotiosianat Dalam Sintesis Terbitan Tiourea Tindak Balas Lama Tetapi Produk Dan Mekanisma Baru

Bohari M. Yamin

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Universiti Kebangsaan Malaysia
email: bohari@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Pada amnya sebatian karbonil klorida bertindak balas dengan ammonium tiosianat menghasilkan karbonil isotiosianat yang boleh dijadikan bahantara untuk mensintesis pelbagai terbitan tiourea melalui tindak balas dengan sebatian amina. Ia perlu dilakukan secara insitu untuk mengelakkan hidrolisis sebatian klorida atau isotiosianat tersebut. Dalam keadaan tertentu pelarut dan jenis amina boleh mempengaruhi tindak balas dan menghasilkan produk diluar jangkaan. Peranan pelarut dapat ditunjukkan oleh tindak balas benzoilisotiosianat dengan metionin dalam aseton menghasilkan 2,(3-benzoiltioreido)-4-metilsulfonilbutirik sebaliknya dalam etanol menghasilkan N-benzoil-N'etiltiourea. Sinamoilisotiosianat bertindak balas dengan 2-morfolinoetilamina dalam aseton menghasilkan 1-(2-morfolinoetil)-3-(3-fenilakriloil)tiourea tetapi tindak balas dengan analin dalam pelarut yang sama menghasilkan sebatian siklik 4,4,6-trimetil-1-fenil-3,4-dihidropirimidina-2(1H)-thione. Tidak semua karbonil klorida bertindak balas dengan ammonium tiosianat menghasilkan isotiosianat. Penemuan 1-2-(o-toluidino)-4-metiltiazol-5-il)etanon daripada 3-kloroasetilaseton dengan ammonium tiosianat dan o-toluidin memberi peluang baru untuk mensintesis pelbagai terbitan siklik tiazol. Mekanisme tindak balas ini memerlukan pembentukan tiosianat iaitu 3-tiosianatopenta-2,4-dion. Sesungguhnya kedua-dua isotiosianat dan tiosianat mempunyai reaktiviti apabila bertindak balas boleh menghasilkan sesuatu yang diluar jangkaan dan memberi peluang kepada penerokaan mekanisme yang baru.

Kata kunci: benzoilisotiosianat, isotiosianat, tiosianat, 3-tiosianatopenta-2,4-dion

1. Pendahuluan

Rikabina molekul dan sintesis terbitan tiourea kebelakangan ini mula mendapat perhatian kerana penemuan potensi sebagai agen aktif terhadap bakteria, fungi dan virus termasuk HIV. Sebatian feniletiltiourea dengan rekabina drug secara rasional telah dikenal pasti sebagai perencat non-nukleosid imunodefisiensi virus-1RT manusia [Mao *et al.*, 1993; Uckun *et al.*, 1999a, 1999b]. Di samping itu kehadiran kumpulan tion membolehkan ia membentuk kompleks atau kelat dengan pelbagai logam dan ini membolehkan kajian dalam bidang pemisahan logam, jerapan dan lain-lain termasuk aspek aplikasi binaan peranti diteroka.

Teknik dan kaedah sintesis sesuatu terbitan tiourea merupakan satu cabaran antara ahli kimia sintesis. Salah satu kaedah yang mudah untuk mensintesis terbitan organikkarboniltiourea seperti benzoiltiourea adalah menggunakan organikisotiosinat. Kumpulan kami telah memberi tumpuan mensintesis dan mengkaji struktur sebanyak mungkin terbitan tiourea baru yang akan diaplikasi kepada pelbagai bidang yang berpotensi. Tindak balas sintesis melalui penyediaan organik isotiosianat telah lama diketahui. Namun demikian tidak semua tindak balas karbonil halida menghasilkan organik isotiosianat dan tindak balas organik isotiosianat dengan sebatian amina pula boleh

memberikan produk yang diluar dugaan yang menjadikan meknisme tindak balas lebih rumit. Kertas ini mengemukakan beberapa aspek luar dugaan yang dimaksudkan.

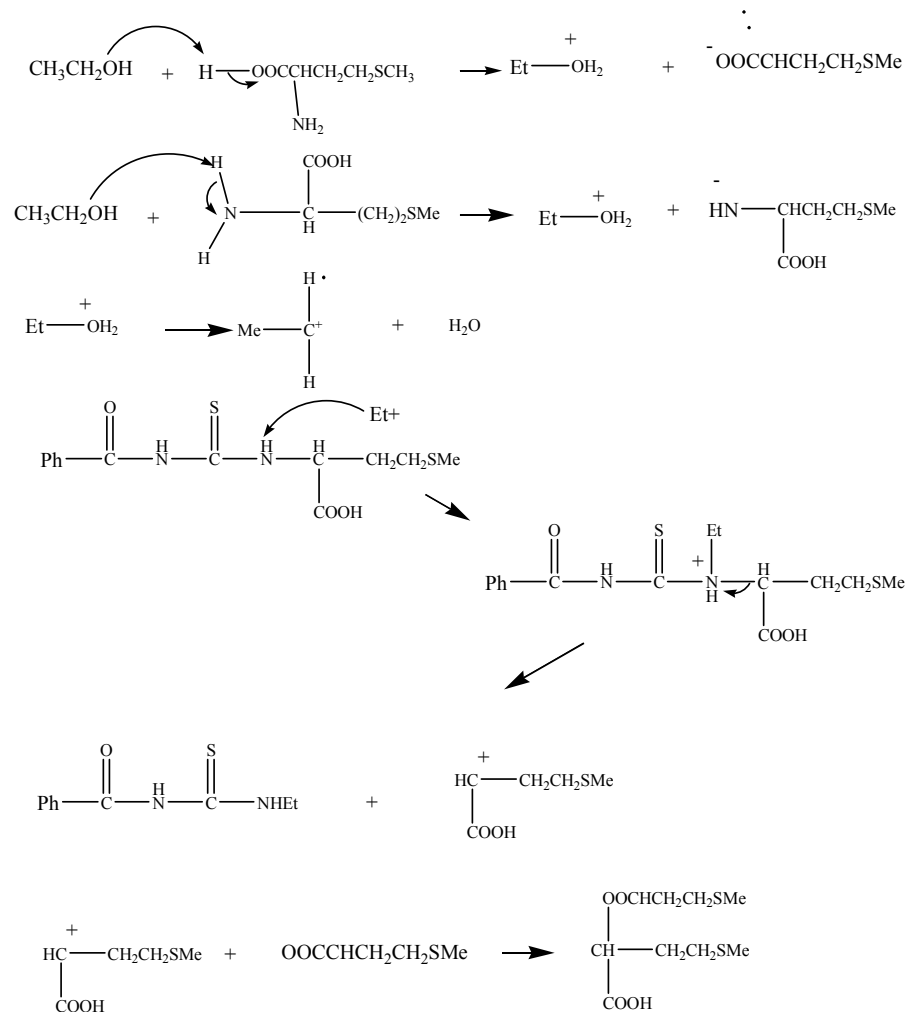
2.Percobaan

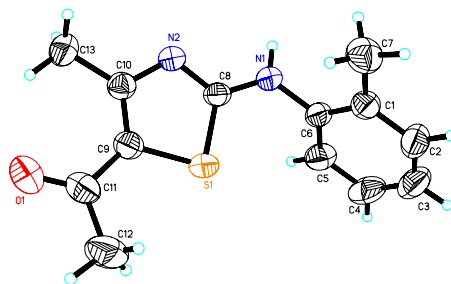
Pada amnya terbitan sebatian organik karboniltiourea boleh disintesis dengan menindak balas karbonilisotiosinat yang disedia secara *insitu* dengan sebatian amina yang dikehendaki dalam pelarut yang sesuai seperti alkohol dan aseton. Biasanya campuran bahan tersebut direfluks beberapa jam dan boleh dituang ke dalam ais untuk memperoleh mendak yang kemudian dicuci dan dikeringkan. Sebagai contoh (2.00 g, 0.016 mol) 2-(klorofenil)anilin dalam 50 ml aseton

dicampur dengan 4-metoksifenilbenzoil isotiosianat pada kepekatan yang sama dalam kelalang 2-leher. Selepas direfluks selama 2 jam larutan dicurah kedalam bikar yang mengandungi ketulan ais. Mendak putih yang terhasil dicuci dengan air suling dan etanol sejuk. Penghabluran semula dilakukan dalam pelarut etanol atau pelarut lain yang sesuai. Pencirian struktur dilakukan dengan teknik analisis unsure, spektroskopi yang lazim dan juga difraktometri hablur tunggal.

3. Hasil dan pembahasan

Spektrum NMR produk tindak balas benzoil isotiosianat dengan metionin dalam alkohol tidak menunjukkan kehadiran isyarat proton bagi produk yang dijangkakan tetapi



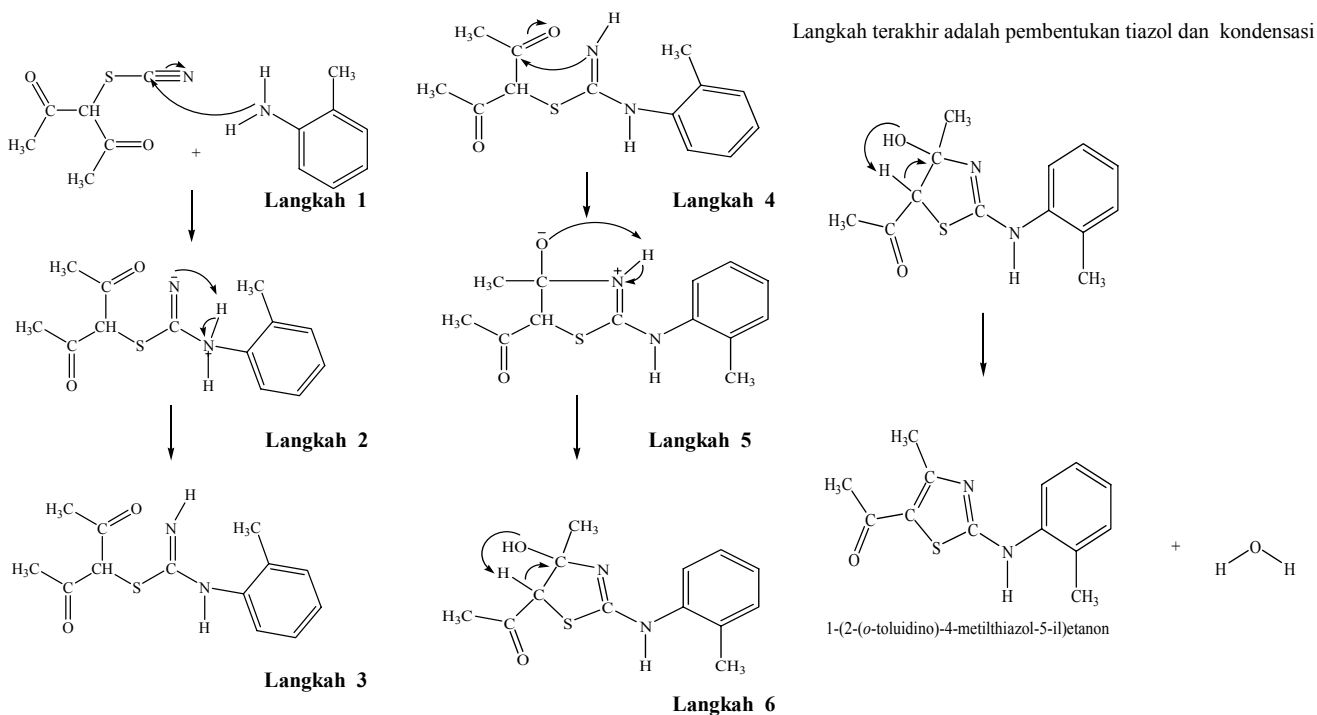


Rajah 2. Struktur dan skema penomboran 4-metil-5-asetil -2-(o-toluidinil)-1,3 tiazol pada kebarangkalian 50% ellipsoid.

sebaliknya kehadiran isyarat CH₂ dan Me. Spektrum ¹³C NMR dan analisis mikrounsur CHNSO menunjukkan ia adalah N-benzoil-N'etiltiourea. Kajian kristalografi sinar-X menunjukkan ia mempunyai konfigurasi *cis-cis* bagi kedudukan kumpulan benzoil dan etil terhadap kumpulan tion pada paksi C-N masing-masing. (Yamin & Yusof, 2003). Sifat ini berbeza dengan terbitan benzoil yang mempunyai kumpulan aril pada atom N ke dua (Yusof & Yamin, 2004; Yamin *et al.*, 2004a, 2004b). Konfigurasi *cis-cis* tersebut membolehkan ia berfungsi sebagai ligan bidentat. Sebaliknya tindak balas yang sama

dilakukan dalam aseton menghasilkan 2,(3-benzoiltioreido)-4-metilsulfonyl butirik seperti yang dijangkakan.

Jelas sekali etanol pasti memainkan peranan hinggakan tiourea yang terbentuk mengalami interaksi seterusnya seperti mekanisme yang dicadangkan di bawah (Rajah 1). Pembentukan moiety tiourea menunjukkan serangan nukleofilik bes nitrogen kepada karbon C=S pasti berlaku dan membentuk 2,(3-benzoiltioreido)-4-metilsulfonyl butirik. Kumpulan etil pasti datang daripada etanol yang boleh membentuk ion karbonium melalui



Rajah 3. Mekanisme pembentukan)-4-metil-5-asetil -2-(o-toluidinil)-1,3 tiazol

interaksi dengan metionin.

Tindak balas 3-kloroasetilaseton dengan ammonium tiosianat diikuti dengan o-toluidin dijangka menghasilkan asetilasetontoluidiniltiourea. Walau bagaimanapun analisis mikrounsur dan NMR tidak bersetuju dengan produk tersebut. Sebaliknya kajian kristalografi sinar-X menunjukkan struktur molekul (Rajah 2) 4-metil-5-asetil-2-(o-toluidinil)-1,3-tiazol (Yamin *et al.*, 2005b) yang bersetuju dengan analisis unsur dan spektroskopi.

Pembentukan 1,3-tiazol ini membuka satu kaedah baru untuk menghasilkan pelbagai 4-metil-5-asetil-1,3-tiazol terbitan amina. Pembentukan bahantara 3-isotiosinatoasetilaseton tidak mungkin boleh membawa kepada pembentukan tiazol ini. Sebaliknya pembentukan 3-tiosinatoasetilaseton boleh menghasilkan tiazol yang melibatkan pengsiklikan seperti mekanisme yang dicadangkan di bawah. (Rajah 3).

Kajian kami mendapati pengsiklikan bukan sahaja berlaku dalam kes di atas malah boleh berlaku pada tiosianat atau isotiosianat yang lain. Sebagai contoh sinamoilisotiosianat bertindak balas dengan 2-mofolinoetilamina menghasilkan 1-(2-morfolinoetil)-3-(3-fenilakrilol)tiourea (Yamin & Hassan, 2004b). Sebaliknya tindak balas dengan anilin menghasilkan heterosiklik 4,4,6-trimetil-1-fenil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tion (Yamin *et al.*, 2005a).

4. Kesimpulan

Penggunaan tiosianat dan isotiosianat untuk menghasilkan pelbagai produk baru khususnya pembentukan moiety tiourea masih terbuka luas untuk diterokai. Pengsiklikan merupakan salah satu laluan kepada pembentukan sebatian heterosiklik yang mudah. Namun pelbagai bentuk luar jangkauan boleh berlaku dan ditemui.

5. Ucapan Terimakasih

Setinggi penghargaan ditujukan kepada Kerajaan Malaysia melalui projek IRPA yang telah membolehkan pelbagai penemuan dan penghasilan produk diperoleh dalam penyelidikan ini. Universiti Kebangsaan Malaysia turut menyumbang prasarana dan sokongan terhadap penyelidikan. Kepada anak-anak yang sentiasa menceriakan suasana kerja, M. Sukeri M Yusof, M. Sahali Mardi, Norziana Ngah, Noor Azilah Kasim, Noraini Hamzah, Azuanita M. Akhlar, Nabiah M Shah dan mereka yang pernah berkerja dengan saya diucapkan terima kasih dan teruskan budaya kuat kerja yang telah kamu bina bersama saya.

6. Daftar Pustaka

- Mao, C., Sudbeck, A., Venkatachalam, T.K., and Uckun, F. M. (1999). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1593.
- Uckun, F. M., Pendergrass, S., Maher, D., Zha, D., Tuel-Ahlgren, L., Mao, C., and Venkatachalam, T. K. (1999). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3411.
- Uckun, F. M., Pendergrass, S., Maher, D., Zha, D., Tuel-Ahlgren, L., Mao, C., and Venkatachalam, T. K. (1999). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2721.
- Yamin, B. M and Yusof, M. S. M. (2003). N-Benzoyl-N'phenylthiourea. *Acta Cryst. E* 59, o150-o151.
- Yusof, M. S. M. and Yamin, B. M. (2004). N-Benzoyl-N'-(2-chlorophenyl)thiourea. *Acta Cryst. E* 60, o1403-o1404.
- Yamin, B. M., Yusof, M. S. M. and Shah, N. M. (2004a). N-Benzoyl-N'ethylthiourea. *Acta Cryst. E* 60, o556-o557.
- Yamin, B. M. and Hassan, I. N. (2004b). 1-(2-Morpholinoethyl)-3-(3-phenylacryloyl)thiourea. *Acta Cryst. E* 60, o2513-o2514.
- Yamin, B. M., Kasim, N. A. M. and Hamzah, N. (2005a). 4,4,6-Trimethyl-1-phenyl-3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-thione. *Acta Cryst. E* 60, o55-o57.
- Yamin, B. M., Kasim, N. A. M. and Akhlar, Acta Cryst. E. (2005b). *Acta Cryst.* (submitted)

Chemical Constituents from the Roots of *Goniothalamus macrophyllus* (Annonaceae)

Bong Pei Thing ¹⁾, Laily B. Din ²⁾ dan Nik Idris Nik Yusoff ³⁾

Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

1) e-mail : peithingb@yahoo.co.uk

2) e-mail : lbdin@pkrisc.cc.ukm.my

3) Faculty of Science and Technology, Kolej Universiti Islam Malaysia, C/O Poly-Tech MARA, Section 14, 43650 Bandar Baru Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail : nikzed@yahoo.com

Abstract

Room temperature methanol extraction of the roots of *Goniothalamus macrophyllus* yielded about 4.6% of crude product. Separation of components by standard chromatographic procedures yielded goniothalamine (1) and *N*-methyларistolactam (10-*N*-methyl-3,4-dimethoxyphenanthrene-1-carboxylic acid lactam) (2). The structures were elucidated by 1D and 2D NMR, UV, IR and mass spectrometry.

Keywords: *Annonaceae*; *goniothalamine*; *Goniothalamus macrophyllus*; *N*-methyларistolactam

1. Introduction

The genus *Goniothalamus* (Annonaceae) comprises some 115 species of shrubs and trees, which grow in Asia (Airy-Shaw 1966). In the tropical rain forest of Malaysia, there were around 44 species existed (Din *et al.* 1991). The study of *Goniothalamus spp.* plants which started in 1972 has seen significant development in the last 20 years with more compounds being identified such as styrylpyrones (Zhang *et al.* 1999), furanopyrones (Fang *et al.* 1991), acetogenins (Alali *et al.* 1999), alkaloids (Lu *et al.* 1985), flavonoids (Siedel *et al.* 2000), as well as sesquiterpenes (Ee *et al.* 2001). The bioactivity of compounds derived from these plants has stirred interest among the bioscientists to investigate the anti-cancer, anti-tumor, anti-inflammatory and immunosuppressive properties. Most of the studies have been conducted on the leaves and stem barks of the *Goniothalamus*. In this paper, work on the roots of *Goniothalamus macrophyllus* will be presented.

2. Experimental

General

Melting points were determined using a Electrothermal melting point apparatus. IR spectra were measured as KBr discs and recorded on a Perkin Elmer GX spectrometer where UV spectra were obtained on Shimadzu UV-160 spectrophotometer. Mass spectra were performed on a QP 5050A spectrometer. The ¹H, ¹³C NMR (1D and 2D), HMQC and HMBC spectra were carried out on a JEOL NMR 400 MHz in CDCl₃ with TMS as internal standard.

Plant material, isolation and purification

The roots of *G. macrophyllus* were collected from the forest of Tasik Chini, Pahang. A voucher specimen (SM 380) is deposited at the Universiti Kebangsaan Malaysia Herbarium (UKMB). Powdered roots of *G. macrophyllus* (820g) were soaked in methanol for three times (4 x 2.5L x 3 days). The combined extracts were filtered and the solvent was removed under vacuum using a rotary evaporator and as the result, a dark brown liquid (38g) has been yielded. The crude was then flash

chromatographed under reduced pressure on a silica gel column (230-400 mesh, diam. 8cm, length 20cm) with gradient elution using hexane : ethyl acetate and ethyl acetate : methanol. The chromatography was ended by washing with 100% methanol and 58 fractions were collected totally.

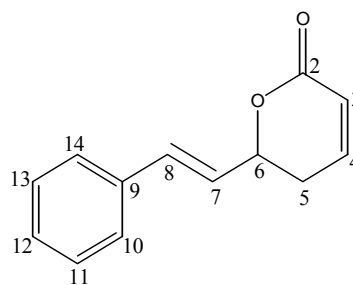
Recrystallization on fraction 17 to 20 gave colorless crystals (1.28g), which were known as goniiothalamine (1), C₁₃H₁₂O₂ (3.37%, m.p. 82.5°C, M⁺, m/e 200), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δppm : 7.30 (m, 5H-ph); 6.87 (dt, H4); 6.70 (dd, H8); 6.25 (dd, H7); 6.02 (dt, H3); 5.03 (m, H6); 2.47 (m, 2H5), ¹³C NMR (CDCl₃) δppm : 163.6 (C=O, C2); 144.8 (C4); 135.4 (C9); 132.7 (C8); 128.4 (C11, C13); 128.0 (C12); 126.4 (C10, C14); 125.4 (C7); 121.0 (C3); 76.9 (C6); 29.5 (C5), IR (KBr) V_{max} cm⁻¹: 1720 (C=O); 1244 (C-O); 969 (C-H); 750 (ortho), UV λ_{max} (MeOH) : 244, 310 and 325nm.

The fraction 17 was then subjected to column chromatography using silica gel Merck 60GF₂₅₄ (230-400 mesh) and 25 vials were isolated. The fourth isolation was further purified on preparative thin-layer chromatography using Hex : EtOAc (4:6) as eluent and yielded N-methylaristolactam (2), C₁₈H₁₅O₃N, as yellowish crystals (4.3mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δppm : 9.24-9.26 (1H, m, H5); 7.87-7.89 (1H, m, H8); 7.82 (1H, s, H2); 7.60-7.62 (2H, m, H6, H7); 7.20 (1H, s, H9); 4.19 (3H, s, NCH₃); 4.13 (3H, s, 4-OCH₃); 4.08 (3H, s, 3-OCH₃), ¹³C NMR (CDCl₃) δppm : 163.7 (CONCH₃); 154.7 (C3); 134.6 (C4); 132.4 (C10); 129.4 (C8a); 128.9 (C8); 127.9 (C7); 127.8 (C5); 127.5 (C4b); 126.5 (C6), 121.0 (C1); 118.7 (C10a); 110.2 (C2); 104.1 (C9), 65.1 (CH₃); 60.7 (4-OCH₃); 57.2 (3-OCH₃), IR (KBr) V_{max} cm⁻¹: 3417 (NCH₃), 1711 and 1655(C=O), UV λ_{max} (MeOH) : 253, 325 and 380nm.

3. Results and Discussion

The methanol extract gave goniiothalamine (1), N-methylaristolactam (2), which were identified by comparison with authentic samples. Most of the *Goniiothalamus* species contain goniiothalamine (1) such as *G. andersonii*, *G. malayanus*, *G. tomentosus*, *G. umbrosus* and *G. uvaroides* (Din *et al.* 2002). There were also other derivatives found such as 5β-hydroxygoniiothalamine,

dehydrogoniiothalamine and 5β-acetoxylgoniiothalamine in these species except in *G. macrophyllus*. Goniiothalamine (1), C₁₃H₁₂O₂, showed strong absorption in its UV spectrum at 244, 310 and 325nm, indicative of a styryl residue (Scott 1964). Strong IR absorption at 1720, 1244 and 750 cm⁻¹ was assigned to an α,β-unsaturated δ-lactone moiety, and 969 cm⁻¹ to a styryl group. The latter deduction was supported by aromatic proton (δ 7.3, m, 5H) and olefinic proton absorptions (δ 6.70, dd, 1H, *J* 15.7; δ 6.25, dd, 1H, *J* 15.7) in the NMR spectrum, which also showed that the olefinic protons had a *trans* configuration (Beak and Abelson 1962). Two olefinic protons were observed at δ 6.02 (dt, 1H, *J* 9.6) and δ 6.87 (dt, 1H, *J* 9.6), which were assigned to H3 and H4 respectively; an allylic methylene at δ 2.47 (m, 2H); and a proton on a carbon bearing the oxygen of the lactone group at δ 5.03 (m, 1H).

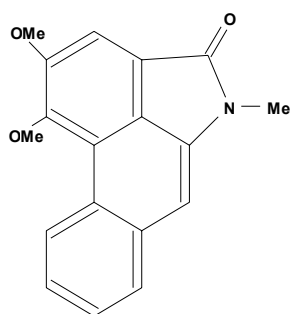


Goniiothalamine (1)

This is the first report which records the existence of N-methylaristolactam (2) in *G. macrophyllus*. According to records from SciFinder, only two reports were found where N-methylaristolactam being isolated. They are *Caldensin, a new natural N-methylaristolactam from Piper caldense* (Cardozo *et al.* 2003) and *Air oxidation of dehydroaporphine with alkali catalyst* (Kunitomo *et al.* 1980). *Piper caldense* is used in Paraiba, Brazil, as a sedative, as an antidote for snakebite and for toothache. Investigation of *Piper caldense* roots afforded a new natural N-aristolactam, named *caldensin*, and previously unreported from natural sources but known from synthesis (Cardozo *et al.* 2003).

Compound (2) was obtained as yellowish needle crystals where its IR spectrum showed a broad absorption at 3417 cm⁻¹ indicated appearance of NCH₃ and 1711 and 1655 cm⁻¹

as signals of C=O lactam. A complete structural elucidation was carried out by examination of the NMR data. Referring to ^1H NMR spectrum, an extra signal was seen at δ 4.19 ppm which representing NCH_3 group, where it was not seen in other usual aristolactams, which have NH instead of NCH_3 . The ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3) revealed two methoxyl peaks at δ 57.2 and 60.7, which correlated to two ^1H singlets (3Hs each) at δ 4.08 and 4.13, respectively (^1H - ^{13}C HETCOR). Examination of the NOESY spectra revealed NOE correlations between the methoxyl ^1H signal at δ 4.08 and the singlet (1H) at δ 7.82 (assigned to H-2), and between the methoxyl signal at δ 4.13 and a multiplet at δ 9.24-9.26 (assigned to H-5). Thus, the methoxyl group which resonates at δ 57.2/4.08 ppm ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$ resonances) is located at C-3 (δ 154.7), while one resonating at δ 60.7/4.13 ppm is at C-4 (δ 134.6). The assignment of ^{13}C resonances for carbons C-3 and C-4 is in agreement with a similar assignment in other 3,4-dimethoxyphenanthrene lactams, which suggested that the chemical shift of C-3 is normally downfield relative to C-4 due to the nonplanar nature of the methoxyl group at C-4 [2, 4] (Omar et al. 1992). Four proton signals at δ 9.24-9.26 (1H, m), 7.60-7.62 (2H, m) and 7.87-7.89 (1H, m) assigned to protons H-5, H-6, H-7 and H-8 of ring C, respectively. This leaves the singlet (1H) at δ 7.20, which is assigned to proton H-9.



N-methylaristolactam (2)

4. Conclusion

Therefore, on the basis of the spectroscopic data and the comparison to literatures, the structures of goniothalamine (1) and N-methylaristolactam (10-N-methyl-3,4-

dimethoxyphenanthrene-1-carboxylic acid lactam) (2) were being determined.

5. Acknowledgements

The research was supported by the IRPA Grant No. 09-02-02-0087 EA228. We thank Mr. Ujang Suki (UKM) for the assistance in collecting and identifying plant material.

6. References

- Airy-Shaw, H.K., (1966). *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns* (edited by Willis) (7th edition), Cambridge University Press, pp. 489.
- Alali, F.Q., Rogers, L., Zhang, Y. and McLaughlin, J.L. (1999). *J. Nat. Prod.* **62**(1): 31.
- Beak, P. and Abelson, H. (1962). *J. Org. Chem.* **27**: 3715.
- Cardozo, Euclides, L.J., Chaves and Maria, C.O. (2003). Caldensin, a new natural N-methylaristolactam from *Piper caldense*. *Pharmaceutical Biology (Lisse, Netherlands)*. **41**(3): 216-218.
- Din, L.B., Said, I.M., Mat Salleh, K., Ahmad, F.B., Latiff, A., Yusoff, N.I., Samsudin, M.W. and Mohamed, R. (1991). Bioresource Utilization: The Biotechnology Option for Malaysia. In Ghazally Ismail(eds.). *Pelanduk Publication Malaysia*, pp. 147.
- Din, L.B., Zakaria, Z., Ahmad, F.B., Chuah, H.S. and Mat Salleh, K. (2002). Styrylpyrone Derivatives from *Goniothalamus kinabaluensis*. *ACGC Chemical Research Communications* **15** : 72-77.
- Ee, G.C.L., Ng, K.N., Rahmani, M. and Taufiq-Yap Y.H. (2001). *Asian J. Chem.* **13**(2): 550.
- Kunitomo, Junichi; Murakami, Yoshiko; Akasu and Michinori. (1980). Air oxidation of dehydroaporphine with alkali catalyst. *Yakugaku Zasshi.* **100**(3): 337-341.
- Lu, S.T., Wu, Y.C. and Leou, S.P. (1985). *Phytochem.* **24**(8): 1829.
- Omar, S., Chang, L.C., Ahmad, F., Jiu, X.N., Jaber, H., Huang, J and Nakatsu, T. (1992). Phenanthrene Lactams from *Goniothalamus velutinus*, *Phytochem.* **31**(12): 4395-4397.
- Scott, A.I. (1964). *Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products*. London: Pergamon Press, pp. 98.
- Siedel, V., Bailleul, F. and Waterman, P.G. (2000). *Phytochem.* **55**(5): 439.
- Zhang, Y.J., Zhou, G.X., Chen, R.Y. and Yu, D.Q. (1999). *J. Asian Nat Prod. Res.* **1**(3): 189.



Uji Toksisitas Hasil Degradasi Surfaktan Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS) Sebagai Bahan Deterjen Pembersih

Budiawan¹⁾, Yuni Fatisa

¹⁾Departemen Kimia, FMIPA Universitas Indonesia, Depok, 16424, Indonesia
Email : drbud@ui.edu

Abstrak

Linear alkilbenzena sulfonat (LAS) adalah campuran senyawa-senyawa nonvolatil yang dihasilkan dari sulfonasi linear alkil benzena. LAS merupakan bahan pembersih yang terdapat dalam deterjen.

Penggunaan deterjen telah digunakan secara luas oleh berbagai industri maupun masyarakat, dimana limbah cairnya dibuang langsung ke alam tanpa melalui proses pengolahan dan menyebabkan polusi lingkungan. Telah dilaporkan bahwa LAS bersifat toksik terhadap makhluk hidup akuatik.

Dalam makalah ini akan dilaporkan hasil penelitian tentang optimasi biodegradabilitas mikrobiologi air terhadap LAS berdasarkan waktu paruhnya (DT_{50}) dan identifikasi serta uji toksisitas relatif produk intermediet yang dihasilkan. Pada konsentrasi medium yang digunakan (20 ppm), waktu adaptasi dan pertumbuhan bakteri *Acinetobacter* sp telah menunjukkan kemampuan biodegradasi yang lebih baik dari ketiga jenis bakteri lainnya (*Pseudomonas putida*, *pseudomonas fuorecence*, *Bacillaria* spp), sehingga bakteri tersebut digunakan untuk penelitian lebih lanjut terhadap biodegradasi LAS.

Berdasarkan waktu paruh untuk biodegradasi LAS dalam kultur *Acinetobacter* sp yaitu $\pm 52,32\%$ dan kultur campuran yaitu $\pm 46,82\%$ tercapai pada hari ke-4, maka LAS dapat dikategorikan sebagai senyawa yang mudah terdegradasi.

Uji toksisitas berdasarkan reduksi tetrazolium dye dengan bakteri *Rhizobium* meliloti yang mengakibatkan peningkatan warna, jika senyawa toksik merusak membran plasma maka intensitas warna akan berkurang. LAS sebagai senyawa induk bersifat lebih toksik dibandingkan produk intermediet hasil degradasinya dengan nilai $IC_{50} = 34,35$ ppm, sedangkan produk intermedietnya yaitu bahan Ac dan bahan Cm masing-masing adalah 446,19 ppm dan 111,28 ppm.

Identifikasi produk intermediet menggunakan analisis IR dan LC-MS menunjukkan bahwa dalam produk tersebut masih terdapat gugus-gugus fungsi benzena, asam benzoat, hidroksil, karbon alifatik, dengan berat molekul yang masih besar. Dengan demikian proses biodegradasi LAS hingga tercapai waktu paruh hanya terjadi reaksi pada rantai karbon alifatik, belum sampai pada tahap pembukaan cincin aromatik.

Kata kunci : Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS), Tetrazolium dye, Biodegradasi, *Rhizobium* meliloti

1. Pendahuluan

Jumlah dan jenis polutan dewasa ini semakin meningkat seiring meningkatnya produksi dan penggunaan bahan-bahan kimia dalam industri dan rumah tangga. Sebagaimana berbagai laporan diketahui bahwa pencemaran air, udara

dan tanah dapat terjadi karena buangan limbah yang tidak terkontrol dan sering berdampak terhadap kesehatan dan lingkungan. Salah satu penanggulangan terhadap bahaya penyebaran limbah adalah dengan mengurangi, menghilangkan atau merubah senyawa aktif

berbahaya menjadi senyawa yang tidak berbahaya, diantaranya adalah melalui proses biodegradasi. Penggunaan mikroorganisme secara langsung dalam proses perlakuan air limbah adalah usaha yang sangat sederhana dan ekonomis dalam pemanfaatan kemampuan mereka untuk beradaptasi dengan spesifik dan mendegradasi senyawa berbahaya (Fujita & Ike, 1994). Deterjen atau bahan pembersih sejenis lainnya merupakan senyawa kimia yang banyak digunakan dalam domestik maupun industri. Bahan-bahan ini diketahui merupakan salah satu penyebab utama pencemaran tanah ataupun sumber air bagi makhluk hidup.

Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS) adalah surfaktan anionik yang digunakan secara luas untuk menggantikan golongan Alkil Benzena Sulfonat (ABS) sebagai bahan pembersih (detergen). Produksi dunia tahunan untuk surfaktan tidak termasuk sabun, dalam tahun 1990 diperkirakan mencapai 7 juta ton. Sedangkan pada tahun 1997 produksi surfaktan meningkat mencapai 18 juta ton. Sejak tahun 1990, LAS menjadi perhatian peneliti karena terbukti residu LAS ditemukan pada limbah lumpur yang digunakan untuk lahan pertanian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LAS terdistribusi dominan dalam air (97,5 %), tanah (0,5 %) dan sedimen (2 %).

LAS mampu dibiodegradasi di bawah kondisi aerobik. Degradasi aerobik melewati rute degradasi secara umum yang dinamakan ω -oksidasi pada kelompok rantai alkil terminal asam karboksil dan selanjutnya β -oksidasi pada siklus asam lemak menghasilkan CO_2 , H_2O dan SO_4^{2-} . Telah dilaporkan bahwa *Pseudomonas* Spp sanggup untuk tumbuh pada beberapa aromatik sulfonat (Focht & William, 1970). *Pseudomonas* spp resisten terhadap kelaparan dan dapat tetap hidup saat periode lama dalam ekosistem yang mengandung populasi mikrobial alami. Bakteri alami *Comamonas testosteroni* T-3, mempunyai kemampuan mendegradasi *P-toluen* sulfonat (pTS) sebagai model senyawa aromatik (Locher, 1991). Sedangkan dalam biodegradasi, LAS membutuhkan keberadaan komunitas beberapa spesies bakteri termasuk *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* spp., dan *Acinetobacter* sp. (Chhabra, 1996).

LAS sangat sedikit didegradasi di bawah kondisi anaerobik. Hal ini dikarenakan rantai alifatik tidak dapat direduksi lebih lanjut, dan

bakteri anaerobik ditekan pada konsentrasi sulfonat 15 g/kg dalam kondisi tes. Dalam reaktor pada konsentrasi yang tinggi (> 30 g/kg) sodium sulfonat sulit dilarutkan sehingga mengurangi bioaktivitas, dan ini berarti bahwa senyawa ini sangat keras (AISE & CESIO, 1999).. Dalam ekotoksikologi, sejumlah besar test mendapatkan bahwa LAS dapat menyebabkan toksisitas akut dan kronik pada organisme akuatik. LAS dengan konsentrasi 20-30 % larutan dapat menyebabkan kerusakan jaringan pada tikus setelah kontak kulit lebih dari 15 hari. Pada konsentrasi 25 mg/L LAS, ikan bereaksi dengan pola meningkatnya aktivitas, inaktivasi dan immobilisasi, dan jika tidak dihilangkan dari sistem akan menyebabkan kematian. Efek minimal yang berhubungan dengan perubahan biokimia dan hispatologi dalam liver telah dilaporkan dalam studi subkronik terhadap tikus yang diberi konsentrasi LAS 120 mg/kg berat badan perhari di dalam makanan atau air minum.

Berdasarkan pengamatan mengenai amat vitalnya kebutuhan air dan cukup tingginya pemakaian LAS oleh masyarakat dan industri, sedangkan telah diketahui bahwa LAS bersifat toksik dan waktu biodegradasi LAS 100 % membutuhkan waktu beberapa hari, maka penelitian ini difokuskan pada optimasi kemampuan biodegradabilitas mikrobiologi air terhadap LAS serta karakteristik dan toksisitas relatif produk intermediet hasil degradasi LAS terhadap bakteri *Rhizobium meliloti*. Hal ini dilakukan untuk memprediksi apakah produk intermediet hasil degradasi tersebut aman bagi lingkungan atau bahkan lebih toksik dibandingkan senyawa asalnya. Penelitian ini difokuskan dengan tujuan pada optimasi kemampuan biodegradabilitas mikrobiologi air terhadap LAS serta identifikasi dan toksisitas relatif produk intermediet hasil degradasi LAS terhadap bakteri *Rhizobium meliloti*. Adapun produk intermediet yang dimaksud adalah produk yang terbentuk setelah waktu paruh (*Degradation Time*) DT_{50} untuk memprediksi apakah produk intermediet hasil degradasi aman bagi lingkungan atau bahkan lebih toksik dibandingkan senyawa asalnya.

2. Percobaan

2.1 Bahan: Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Linear alkilbenzena sulfonat (LAS), *Nitro Blue Tetrazolium dye* $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$ (2,2'-Di-*p*-nitrofenil-5,5' difenil-3,3'-[3,3'-dimetoksi-4,4'-difenil]-tetrazolium klorida), etanol teknis 70%, agar batang, aquabidest, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl , glukosa, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, Mannitol, yeast, agar dan sampel air dari waduk Setia Budi Jakarta Pusat dan Bakteri *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillaria* spp, *Acinetobacter* sp (bakteri didapat dalam bentuk terinokulasi dari LIPI Mikrobiologi Bogor yang merupakan hasil isolasi dari sampel air dari waduk Setia Budi Jakarta Pusat), dan bakteri *Rhizobium meliloti*.

2.2 Peralatan: Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut : Sentrifugasi, Autoklaf, spektrometer UV-Vis, mikroskop, jarum ose, pH meter, HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometer*), Spektrofotometer Infra Merah (IR) dan peralatan gelas lainnya.

2.3 Cara Kerja

Uji Pendahuluan

Kultivasi Mikroorganisme : Ke dalam labu erlenmeyer yang telah berisi medium MSM + LAS (konsentrasi 10, 20, dan 30 ppm) dan larutan blanko, masing-masing ditambahkan bakteri *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescent*, *Bacillus subtilis*, dan *Acinetobacter*. Kemudian semua larutan diinkubasi pada suhu kamar dengan laju pengocokan 200 rpm. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri dengan mengukur nilai optikal densitasnya menggunakan spektroskopi sinar tampak pada panjang gelombang 600 nm.

Pengujian Kemampuan Isolat/Perlakuan Biodegradasi

Pengujian kemampuan isolat untuk perlakuan biodegradasi selanjutnya adalah terhadap larutan arisifisial yang mengandung konsentrasi LAS dengan pertumbuhan bakteri yang paling optimum dari hasil uji pendahuluan.

Dari data yang diperoleh dari uji pendahuluan tersebut didapat hasil optimal menggunakan bakteri *Acinetobacter* sp dan campuran mikroorganisme dengan konsentrasi LAS 20 ppm. Campuran mikroorganisme digunakan dalam uji ini untuk membandingkan optimasi biodegradasinya dengan optimasi biodegradasi bakteri tunggal.

Penentuan Biomassa Bakteri: Pertumbuhan bakteri diamati dengan mengukur optikal densitas menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang, $\lambda = 600$ nm. Selanjutnya Biomassa dan sampel dipisahkan dari supernatannya dengan cara sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 16.000 rpm.

Analisis kadar LAS dan Produk Intermediet Hasil degradasi untuk mengetahui perubahan konsentrasi substrat selama waktu inkubasi dan produk degradasi, dilakukan secara analisis dengan HPLC.

Identifikasi Senyawa Intermediet Hasil Degradasi LAS

Identifikasi produk intermediet hasil degradasi LAS dilakukan dengan HPLC-MS dan Spektrometer IR.

2.4 Perlakuan Terhadap Sampel Air

Tercemar

Isolasi Bakteri

Sampel air yang tercemar LAS diambil dari waduk Setia Budi, Jakarta yang merupakan tempat pembuangan limbah domestik dan industri terutama limbah deterjen. Bakteri diisolasi untuk mengetahui bakteri pendegradasi LAS di alam. Isolasi bakteri dalam penelitian ini dilakukan oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan Mikrobiologi-LIPI Bogor.

Pengukuran Konsentrasi LAS

Konsentrasi LAS ditentukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau HPLC.

2.5 Uji Toksisitas Produk Intermediet hasil degradasi LAS

Kultur *Rhizobium meliloti* dalam Medium Padat Luria Berthany (LB): Sebanyak 1 lup kultur bakteri *Rhizobium meliloti* inokulasikan pada media padat LB (10 g tripton, 5 kg ekstrak yeast, 5 g NaCl, dan 15 gr agar) secara aseptis dan diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam, dilakukan regenerasi berulang sebelum siap digunakan.

Pertumbuhan Bakteri *Rhizobium meliloti*: *Rhizobium meliloti* ditumbuhkan dalam medium YEMA (0,5 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $MgSO_4$; 0,1 g NaCl, 3 g $CaCO_3$, 10 g Mannitol, 20 g Agar (untuk medium padat); 0,5 g yeast; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $(CH_4)_2SO_4$, dan 0,1 g $CuSO_4$). Bakteri *Rhizobium meliloti* dari kultur media padat LB dinokulasikan ke medium ini dan

diinkubasikan selama 8 jam. Sel dipanen dari medium YEMA, lalu dikumpulkan dengan sentrifugasi (1000 rpm) dan dicuci dua kali dengan 0,2 M buffer fosfat, pH 7,5. Setelah sel dicuci lalu diresuspensikan dalam buffer fosfat sampai absorban 0,3 (550 nm).

Uji Toksisitas: Uji dibentuk dengan mencampurkan buffer Tris HCl (0,1 M, pH 7,5), 1,2 ml sampel (variasi konsentrasi atau volume senyawa toksik dimana uji tetap diperlakukan dalam volume tabung yang konstan), dan 1 ml sel dalam tabung 13 x 110 mm. Absorban ini diukur pada waktu = 0 menit pada 550 nm. Selanjutnya 0,1 ml MTT (*tetrazolium dye*), 0,0012 M ditambahkan ke dalam setiap tabung dan dikocok dengan vortek dan tabung diinkubasi pada 30°C dengan water bath. setelah 20 menit inkubasi absorban kembali diukur. Selisih absorban antara T = 0 dan absorban akhir merupakan “absorban” yang digunakan dalam perhitungan toksisitas.

Perhitungan Toksisitas: Untuk perhitungan toksisitas, data diplotkan dalam bentuk grafik yang merupakan variasi konsentrasi atau volume sampel pada sumbu-X dan absorban pada sumbu -Y. Regresi linear diukur dengan $Y = mx + B$, dimana Y adalah absorban kontrol, yaitu sampel tanpa senyawa toksik; m adalah slope garis regresi; B adalah Y intersep (nilai untuk Y saat $x = 0$); $Y/2$ adalah nilai untuk absorban dengan reduksi penghambatan dye 50 %; x adalah konsentrasi senyawa toksik yang dihasilkan dari 50 % penghamatan reduksi dye yang diukur dari absorban $Y_{\text{kontrol}}/2$. Nilai yang didapat ini mengacu sebagai IC50 (Konsentrasi Penghambatan 50 %). Jika R2 untuk koefisien regresi $< 0,080$ data tidak digunakan.

Persamaan ini dapat dirumuskan :

$$x = \frac{y/2 - B}{m}$$

$$\text{Log } x = \frac{y/2 - B}{m}$$

Untuk beberapa senyawa kimia antilog pada log x terkadang harus digunakan yang

merupakan konsentrasi senyawa kimia yang dihasilkan dalam 50 % penurunan absorban jika data yang ada tidak dapat digunakan.

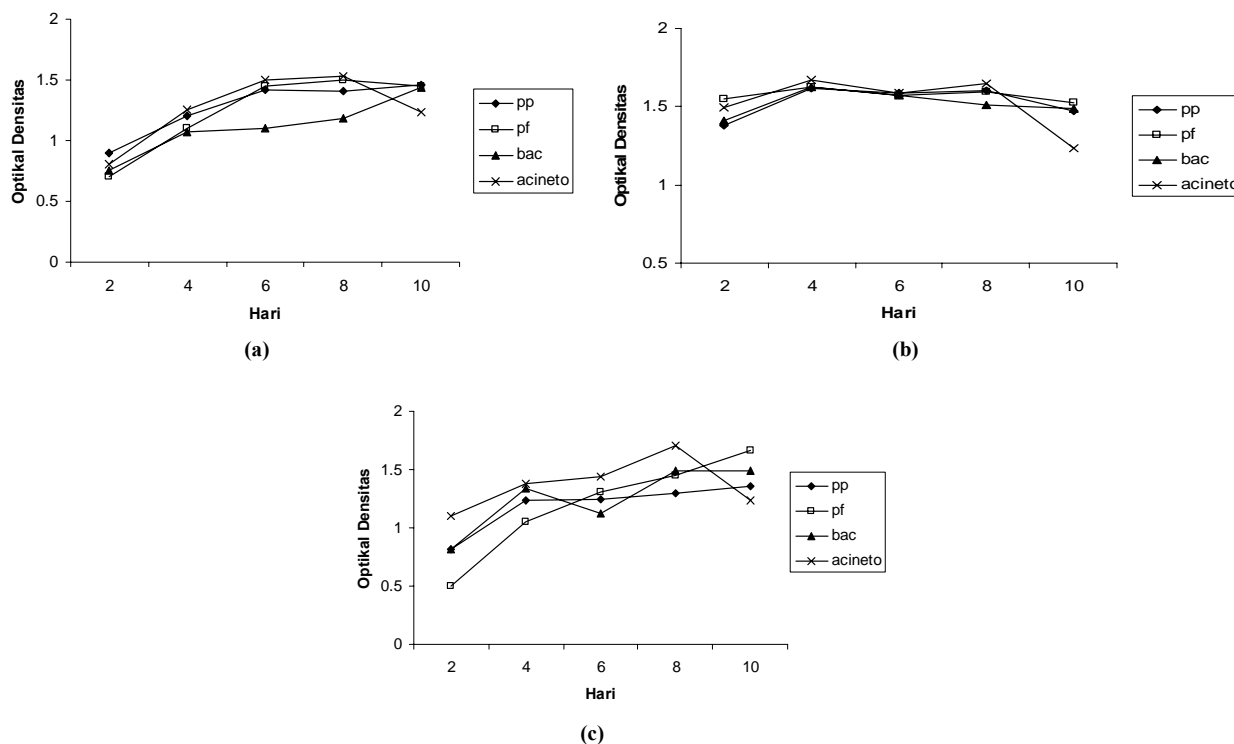
4. Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu dan kemampuan optimasi biodegradasi bakteri alam serta untuk identifikasi produk intermediet hasil degradasi LAS sebagai bahan utama deterjen, disamping sifat toksisitasnya. Untuk itu dilakukan pengukuran biomassa (turbiditas) dan perubahan konsentrasi LAS selama proses degradasi. Pengukuran turbiditas didasari oleh adanya konsumsi substrat oleh bakteri, sehingga bakteri tumbuh dan berkembang biak dalam sampel yang diuji selama masa inkubasi. Selain itu, untuk mengetahui apakah produk hasil biodegradasi tersebut masih bersifat toksik atau bahkan lebih toksik dari senyawa asalnya, maka dilakukan identifikasi dan sifat toksisitas produk intermediet hasil biodegradasi.

Pengambilan produk intermediet dibatasi pada waktu tercapai *Degradation Time* (DT_{50}), yaitu suatu ukuran waktu dimana 50 % senyawa induk hilang atau terurai dalam tanah atau air. Selain itu LAS merupakan senyawa kimia xenobiotik polutan di badan air, telah dilaporkan dari studi sebelumnya bahwa biodegradasi LAS 100% membutuhkan waktu beberapa hari, sedangkan air merupakan kebutuhan yang sangat vital bagi masyarakat. Dengan demikian adalah penting untuk mengetahui bagaimana toksisitas senyawa kimia yang terbentuk selama proses biodegradasi.

Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan seperti yang tertera diatas maka penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap, tahap pertama adalah uji pendahuluan, uji ini untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme bakteri yang mampu mendegradasi LAS, tahap kedua adalah pengujian ulang terhadap kemampuan bakteri, tahap ketiga adalah identifikasi dan uji toksisitas produk intermediet hasil biodegradasi.

Penelitian ini adalah penelitian awal dimana uji toksisitas dengan organisme bakteri diharapkan menjadi uji penapisan pendahuluan yang dapat mengeliminasi beberapa tahapan uji untuk penelitian lebih lanjut terhadap bahan-bahan kimia yang bersifat toksik atau identifikasi



Gambar 1. Kurva Optik Densitas Bakteri pada Konsentrasi LAS (a) 10 ppm, (b) 20 ppm dan (c) 30 ppm

awal yang identik dengan sifat mutagen atau karsinogen suatu bahan kimia.

Uji Pendahuluan Bakteri Pendegradasi

LAS: Untuk mengamati kenaikan biomassa terhadap pertumbuhan koloni-koloni pada media uji dengan konsentrasi LAS 10, 20, dan 30 ppm, maka dilakukan pengukuran absorbansi terhadap turbiditas bakteri pada setiap waktu sampling. Analisis dilakukan pada panjang gelombang maksimum, $\lambda = 600$ nm. Adanya kenaikan turbiditas mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu memanfaatkan substrat sebagai makanannya untuk digunakan pada proses perkembangbiakannya. Hasil pertumbuhan bakteri yang mampu mendegradasi LAS pada media dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari sejumlah faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kecepatan biodegradasi diantaranya adalah ukuran populasi, daya adaptasi dari mikroba dalam hal ini jenis bakteri yang digunakan dan jumlah konsentrasi senyawa kimia yang didegradasi.

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa pertumbuhan berjalan lambat untuk semua jenis bakteri pada konsentrasi LAS 10 ppm,

pertumbuhan bakteri pada konsentrasi LAS 20 ppm berjalan optimal dan pada konsentrasi LAS 30 ppm, pertumbuhan bakteri kembali lambat. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: pada konsentrasi LAS 10 ppm, pertumbuhan bakteri sangat lambat, disebabkan LAS yang digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan bakteri kurang mencukupi untuk jumlah bakteri yang ada dalam media. Sedangkan dalam media yang mengandung konsentrasi LAS 20 ppm, pertumbuhan bakteri lebih tinggi atau lebih optimal dibandingkan dalam media yang mengandung LAS 10 ppm, yang berarti bahwa konsentrasi LAS 20 ppm dapat dimanfaatkan oleh bakteri-bakteri yang ada dalam media sebagai substrat atau mencukupi untuk pertumbuhannya. Sedangkan pada konsentrasi LAS 30 ppm pertumbuhan bakteri mulai mengalami penurunan kembali, karena LAS yang terdapat dalam medium merupakan senyawa racun, sehingga dalam konsentrasi tinggi akan semakin menghambat proses adaptasi atau pertumbuhan bakteri.

Pada konsentrasi 20 ppm di atas yang dipilih untuk uji selanjutnya, dapat dilihat bahwa dari keempat jenis bakteri yang ada (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillaria* spp, *Acinetobacter* sp), bakteri *Acinetobacter*

menunjukkan kemampuan degradasi yang lebih baik dari yang lain. Maka dalam pengujian selanjutnya dipakai bakteri *Acinetobacter* sebagai bakteri pendegradasi LAS. Sebagai pembanding digunakan campuran dari ketiga jenis bakteri lainnya. Hal ini dilakukan untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi LAS dalam bentuk tunggal dan simbiosisnya, mengingat dari penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa dalam biodegradasi, LAS membutuhkan keberadaan komunitas beberapa spesies bakteri *Flavobakterium* sp, *Pseudomonas* spp dan *Acinetobacter* sp dengan hasil degradasi utama mencapai 90 % pada hari ke-tujuh (Gard-Terech & Palla, 1986 dalam Chhabra, 1996).

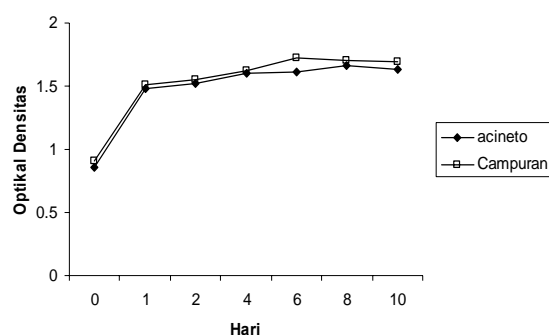
Pengujian Ulang Kemampuan Bakteri

Bakteri yang diuji ulang adalah kultur bakteri tunggal (*Acinetobacter* sp) dan campuran dari ketiga jenis yang ada. Pengujian dilakukan pada konsentrasi LAS 20 ppm dalam medium. Pengukuran kenaikan turbiditas bakteri dilakukan dengan spektrometer sinar tampak pada $\lambda = 600$ nm. Sedangkan pengukuran penurunan konsentrasi LAS dan karakterisasi senyawa intermediet hasil; degradasi dilakukan dengan HPLC-MS.

Pengukuran Pertumbuhan (Turbiditas) Bakteri

Pertumbuhan bakteri selama proses biodegradasi LAS dapat dilihat dalam Gambar 2 dimana bakteri mengalami penambahan jumlah sel. Hal ini menunjukkan bakteri dapat tumbuh dalam medium yang ada.

Hasil pengamatan menunjukkan terjadinya kenaikan nilai absorbansi dari hari pertama sampai hari keenam. Pengamatan dihentikan pada hari kesepuluh karena pada hari kedelapan



Gambar 2. Kurva Optikal Densitas yang Sebanding dengan Jumlah Bakteri

absorbansi sudah mulai menunjukkan penurunan, yang mengindikasikan bahwa substrat (LAS) dalam medium kemungkinan sudah berkurang, dan bakteri sudah mulai memasuki fase kematian dalam pertumbuhannya, kurva pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan oleh nilai absorbansi terlihat pada Gambar 2.

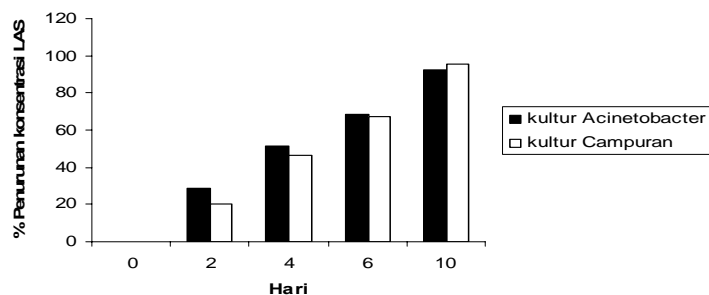
Dari kurva jelas terlihat bahwa kultur *Acinetobacter*, menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan kultur campuran dari keempat jenis bakteri, dan dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor-faktor yang saling berhubungan. Banyak peneliti melaporkan parameter utama yang mempengaruhi degradasi yaitu : Fenomena kompetisi, predator, komposisi medium, parameter fisik seperti suhu dan jumlah oksigen (Goldstein *et al.*, 1985). Jadi, kemampuan mikroorganisme untuk hidup dan tumbuh bergantung pada fisiologi mereka, toleransi terhadap kondisi lingkungan, dan kapasitas untuk bersaing dengan organisme lain.

Kenaikan nilai absorbansi pada tahap ini berbeda dengan tahapan pada uji pendahuluan sebelumnya, dimana pada tahap ini kenaikan bakteri pada hari pertama khususnya untuk kultur bakteri *Acinetobacter* sudah memperlihatkan kenaikan absorbansi yang cukup tinggi dibandingkan kultur bakteri *Acinetobacter* dalam uji pendahuluan (lihat Gambar 1 (b) dan Gambar 2).

Perbedaan ini dikarenakan dalam uji pendahuluan bakteri harus melewati fase aklimasi, yaitu proses adaptasi oleh suatu mikroorganisme jika mengalami pergantian medium atau kondisi. Pada fase ini tidak ada penurunan dari jumlah zat yang akan didegradasi. setelah proses aklimasi, kekuatan mikroorganisme untuk mendegradasi mungkin akan lebih cepat atau lambat. Biasanya setelah mikroorganisme itu melalui proses aklimasi, untuk penambahan zat kedua kalinya tidak akan mengalami proses ini lagi (Widodo, 2001).

3. Pengukuran Konsentrasi LAS

Selain parameter turbiditas bakteri, parameter lain yang sangat penting untuk membuktikan terjadinya proses degradasi adalah pengukuran konsentrasi LAS yang tersisa selama waktu inkubasi. Penurunan konsentrasi substrat menunjukkan bahwa telah terjadi metabolisme



Gambar 3. Grafik Persentase Penurunan Konsentrasi LAS

substrat tersebut oleh inokulum bakteri yang digunakan (Widodo, 2001). Dalam uji ini konsentrasi LAS yang digunakan adalah 20 ppm.

Dari kedua kultur yang ada, yaitu kultur bakteri *Acinetobacter* dan campuran, Gambar 3 menunjukkan bahwa mulai hari kedua, konsentrasi substrat dalam kultur bakteri *Acinetobacter* sudah menurun hingga 28,93 %, sedangkan kultur campuran 20,43 %. Penurunan konsentrasi LAS terus berlangsung hingga hari ke-10 yaitu 92,42% untuk kultur bakteri *Acinetobacter* dan 95,28 % untuk kultur campuran.

Untuk menentukan mudah tidaknya suatu senyawa dapat terdegradasi, maka dilakukan penentuan waktu paruh DT_{50} , yaitu suatu ukuran dimana senyawa induk hilang atau terurai dalam tanah atau air. Berdasarkan klasifikasi ini seperti yang tertera dalam Gambar 3, yaitu tercapainya DT_{50} untuk kedua kultur terjadi pada hari ke-4, dimana jika nilai $DT_{50} < 20$ hari, maka LAS dapat dikategorikan sebagai senyawa yang mudah terdegradasi (OECD, 2000).

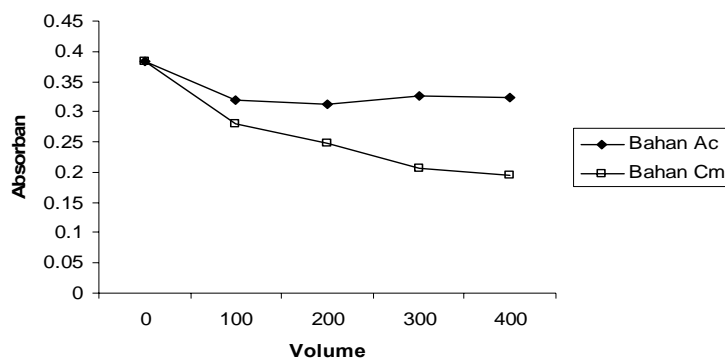
Berdasarkan klasifikasi ini juga dapat dilihat, bahwa waktu paruh DT_{50} untuk biodegradasi LAS dalam kultur *Acinetobacter* yaitu $\pm 52,32$ % tercapai pada hari ke-4, sedangkan untuk kultur campuran yaitu $\pm 46,82$ %. Dari persentasi yang dicapai dalam kedua kultur dapat disimpulkan juga bahwa proses biodegradasi oleh kultur *Acinetobacter* lebih baik dibandingkan kultur campuran. Fenomena ini seperti telah diterangkan di atas bahwa faktor-faktor seperti kompetisi antar mikroorganisme dalam medium mempengaruhi proses biodegradasi dalam kultur campuran. selain hal tersebut juga dapat disebabkan adanya perbedaan kemampuan

bakteri yang digunakan sebagai inokulum dalam mendegradasi senyawa LAS.

Hal ini menunjukkan hasil yang lebih baik dari pada laporan penelitian sebelumnya (Chhabra, 1996), yang menyatakan bahwa waktu paruh untuk biodegradasi aerobik LAS adalah 1-8 hari di dalam air sungai, 1-2 hari dalam sedimen, dan 5-10 hari dalam air laut.

Akan tetapi, jika dilihat dari kecepatan biodegradasi yang menghasilkan penurunan konsentrasi LAS hingga $> 90\%$, biodegradasi kultur campuran lebih cepat dibandingkan kultur *Acinetobacter* dalam mendegradasi LAS hanya hingga tercapai waktu paruh, setelah itu kemampuan mendegradasi sedikit menurun. Sedangkan pada kultur campuran, dimana terdapat beberapa bakteri yang didalamnya juga terdapat *Acinetobacter*, setelah pencapaian waktu paruh, aktivitas degradasi masih tetap berkompeten dilaksanakan oleh bakteri-bakteri lain dalam medium. Fenomena ini juga sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa dalam biodegradasi, LAS membutuhkan keberadaan komunitas beberapa spesies bakteri termasuk *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* spp. dan *Acinetobacter* sp. dengan hasil degradasi mencapai 90% pada hari ketujuh (Chhabra, 1996).

Chhabra (1996) menyatakan bahwa keberhasilan biodegradasi akhir LAS (sedikitnya 80 %) secara normal membutuhkan aktivitas beberapa spesies bakteri. Beberapa mikroorganisme seperti *Acinetobacter* merupakan bakteri pendegradasi senyawa alifatik, sedangkan untuk degradasi senyawa aromatik lebih berpotensi dilakukan oleh bakteri lain seperti *Pseudomonas*, *Bacillus* sp dan lain-lain.



Gambar 4. Kurva Uji Toksisitas Bahan Ac dan Bahan Cm

Dengan membandingkan pengukuran kenaikan turbiditas bakteri dan penerunan konsentrasi LAS, dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan mampu mendegradasi LAS dengan memanfaatkan LAS sebagai sumber karbonnya.

3.3 Uji Toksisitas

Untuk mengetahui apakah produk hasil degradasi tersebut aman bagi lingkungan atau bahkan lebih toksik dari senyawa asalnya, maka dilakukan uji toksisitas terhadap produk intermediet hasil degradasi LAS dari kultur *Acinetobacter* dan kultur campuran. Dalam penelitian ini, uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan organisme indikator yaitu bakteri *Rhizobium meliloti*. Hasil uji toksisitas ditunjukkan dalam Gambar 4.

Selanjutnya, untuk memudahkan penyebutan, maka dilakukan penamaan terhadap produk intermediet dari kedua kultur ini, yaitu bahan Ac dari kultur *Acinetobacter* dan bahan Cm dari kultur campuran.

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengukur tingkat kerentanan bakteri *Rhizobium meliloti* yang digunakan terhadap perusakan sel pada sistem transport elektronnya oleh produk intermediet hasil degradasi LAS, serta menyatakan toksisitas relatif terhadap *Rhizobium meliloti* dengan IC_{50} , yaitu konsentrasi atau volume zat yang dapat menghambat 50 % reduksi *dye* yang dihitung sebagai absorbansi. Parameter ini sebanding dengan LD_{50} (Bostfort, 1996).

Uji ini didasari pada reduksi *dye* oleh bakteri yang dapat menyebabkan peningkatan warna atau optikal absorbansi, jika toksik merusak membran sitoplasma, maka akan menghambat transport elektron sehingga intensitas warna

akan berkurang. Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa absorbansi bahan Ac, dengan kenaikan jumlah volume zat menyebabkan kenaikan jumlah absorbansi. Hal ini berlawanan dengan prinsip percobaan yang seharusnya dengan penambahan konsentrasi atau volume zat uji terjadi penghambatan reduksi sehingga intensitas warna berkurang. Perhitungan IC_{50} adalah 1427,83 μ l, dengan $R = 0,63$. Bostfort et.al (1996) serta Rolf & Sokal (1981) menyatakan bahwa jika koefisien regresi $< 0,8$, maka percobaan dibuang sebagai data statistik yang diragukan.

Akan tetapi, jika perubahan absorbansi zat uji dibandingkan dengan absorbansi kontrol, terjadi penurunan intensitas warna oleh zat uji walau sedikit. Untuk itu karena koefisien regresi untuk bahan Ac $< 0,8$, maka dilakukan pengukuran absorbansi vs log konsentrasi bahan Ac. Antilog x adalah nilai $IC_{50} = 4,12 \times 10^5 \mu$ l dengan $R = 0,896$.

Pada bahan Cm, dapat terlihat bahwa penurunan absorbansi berbanding terbalik dengan kenaikan volume bahan uji yang ditambahkan. Nilai $IC_{50} = 356,89 \mu$ l dengan $R = 0,94$. Data ini menunjukkan bahwa bahan uji dari kultur campuran bersifat toksik dan mampu merusak sistem transport elektron dengan menghambat reduksi *dye* oleh bakteri.

Sebagai pembandingan kedua bahan di atas, maka dalam penelitian ini, juga dilakukan uji toksisitas terhadap LAS sebagai senyawa induk (lihat Tabel 1).

Nilai IC_{50} dari LAS adalah 34,35 ppm, $R = 0,899$. Data ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa LAS dengan konsentrasi yang tinggi ($> 20 - 30$ ppm)

Tabel 1. Uji Toksisitas LAS dalam Variasi Konsentrasi

<i>Senyawa LAS</i>	
Konsentrasi	Absorban
0	0.384
10	0.245
20	0.246
30	0.217
40	0.180

dapat menghambat proses degradasi mikrobial (Chhabra, 1996). Bagaimanapun telah banyak dilakukan penelitian terhadap nilai toksisitas dari LAS. Nilai toksisitas LAS terhadap organisme yang berbeda juga bervariasi. LD₅₀ untuk garam sodium pada tikus secara oral adalah 1259 – 2300 mg/kg, sedangkan pada mencit adalah 3000 mg/kg dan pada kulit marmut adalah 60 mg/kg. Efek reproduktif, termasuk penurunan rata-rata kehamilan dilaporkan dalam hewan yang diberi dosis > 300 mg/kg (Folke dan Landner, 2000).

Dengan membandingkan IC₅₀ dari ketiga senyawa di atas maka LAS sebagai senyawa induk bersifat lebih toksik dibandingkan produk intermedietnya dengan nilai IC₅₀ dari LAS adalah 34,35 ppm, sedangkan bahan Ac nilai IC₅₀ = 1427, 83 µl atau 446,196 ppm, dan bahan Cm nilai IC₅₀ = 356,89 µl atau 111,28 ppm. Sedangkan untuk bahan Ac adalah kurang toksik dibandingkan kedua senyawa di atas.

Identifikasi Produk Intermediet Hasil Degradasi LAS

Analisis Spektrum Infra Merah (IR)
:Analisis produk intermediet hasil degradasi LAS dengan spektrum infra merah (IR) memberikan pita-pita serapan pada daerah bilangan gelombang, ν , (dalam cm⁻¹) yaitu :

Bahan Ac

2965,17 – 3331 merupakan pita serapan vibrasi ulur sangat lebar dari gugus asam karboksilat (COOH)

2840,48 merupakan pita serapan dari gugus alifatik CH₃, CH₂, dan CH

1452,34 dan 1654,41 merupakan pita serapan vibrasi dari gugus C-C aril

1020,75 merupakan pita serapan vibrasi ulur dari SO₃

702,57 merupakan pita serapan dari benzena tersubstitusi

Bahan Cm

2950,80 – 3157,84 merupakan pita serapan vibrasi ulur sangat lebar dari gugus asam karboksilat (COOH)

3566,46 merupakan pita serapan vibrasi ulur dari gugus hidroksil (OH)

2838,42 merupakan pita serapan dari gugus alifatik CH₃, CH₂, dan CH

1452,27 dan 1653,96 merupakan pita serapan vibrasi dari gugus C-C aril

1021,86 merupakan pita serapan vibrasi ulur dari SO₃

687,36 merupakan pita serapan dari benzena tersubstitusi

Analisis Kromatografi Cair-Spektrometer Massa (LC-MS)

Senyawa LAS

Analisis LC untuk LAS menghasilkan waktu retensi (Rt) pada 3,8 menit. Sedangkan untuk MS, fragmen ion [M+H₂]⁺ dengan m/z = 350,9995, selanjutnya terbentuk pola fragmen ion [M+(CH₂)_n + H₂]⁺ dengan m/z = 432,9805., 514,9411., dan fragmen ion [M-(CH₂)_n + H₂]⁺ dengan m/z = 269,0211, 187,0407

Bahan Ac

Spektrum LC-MS dengan waktu retensi yang berbeda dan berat molekul yang berbeda memperlihatkan bahwa bahan Ac terdiri dari berbagai senyawa. Fragmen ion [M+H]⁺ dengan m/z = 372,8306 adalah turunan asam benzoat (C₁₆H₂₃O₅SNa), [M+H]⁺ dengan m/z = 207,0078 adalah C₈H₉O₃SNa, [M+H]⁺ dengan m/z = 187 adalah turunan benzil alkohol (C₇H₆O₄S), [M+H]⁺ dengan m/z = 155 adalah protokatekuat (C₇H₆O₄).

Bahan Cm

Dari spektrum LC-MS yang menunjukkan bahwa di dalam bahan Cm terdapat beberapa senyawa, tetapi lebih sedikit dibandingkan bahan Ac, yaitu : Fragmen ion [M+H]⁺ dengan m/z = 372,8106 adalah turunan asam benzoat (C₁₆H₂₃O₅SNa), [M+H]⁺ dengan m/z = 206,8335 adalah C₈H₉O₃SNa.

Identifikasi produk intermediet menggunakan analisis IR dan LC-MS menunjukkan bahwa produk tersebut masih terdapat senyawa-senyawa benzena, asam benzoat, hidroksil, karbon alifatik, dengan berat molekul yang masih besar. Dengan demikian proses

biodegradasi LAS hingga tercapai waktu paruh hanya terjadi reaksi pada rantai karbon alifatik, belum sampai pada tahap pembukaan cincin aromatik.

Chhabra (1996) menyebutkan bahwa degradasi LAS dimulai pada rantai panjang akhir linear, oleh omega dan β -oksidasi menghasilkan asam sulfonilmono-karboksilat. Senyawa intermediet ini selanjutnya mengalami oksidasi pada cincin aromatik dan terjadi pembukaan gugus sulfonat.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1. Kesimpulan

1. Dalam uji kemampuan ulang biodegradasi:

- Berdasarkan persentase penurunan jumlah LAS pada DT_{50} maka kultur *Acinetobacter*, menunjukkan % penurunan yang lebih besar dibandingkan kultur campuran dalam medium.
- Berdasarkan tercapainya DT_{50} , dimana waktu paruh untuk kedua kultur tercapai pada hari ke-4, maka LAS dapat dikategorikan sebagai senyawa yang mudah terdegradasi.
- Dilihat dari kecepatan biodegradasi yang menghasilkan penurunan konsentrasi LAS hingga > 90 %, biodegradasi kultur campuran lebih cepat dibandingkan kultur tunggal *Acinetobacter*, hal ini disebabkan oleh pengaruh kemampuan optimasi aktivitas biodegradasi mikroorganisme.
- Dengan membandingkan pengukuran kenaikan turbiditas bakteri dan waktu paruh yang dicapai terhadap penurunan konsentrasi LAS, dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan mampu mendegradasi LAS dengan memanfaatkan LAS sebagai sumber karbonnya.

2. LAS sebagai senyawa induk bersifat lebih toksik dibandingkan produk intermedietnya

dengan Nilai IC_{50} dari LAS adalah 34,35 ppm, sedangkan bahan Ac nilai $IC_{50} = 1427,83 \mu\text{l}$ atau 446,196 ppm, dan bahan Cm nilai $IC_{50} = 356,89 \mu\text{l}$ atau 111,28 ppm. Sedangkan untuk bahan Ac adalah kurang toksik dibandingkan kedua senyawa di atas.

3. Identifikasi produk intermediet menggunakan analisis IR dan LC-MS menunjukkan bahwa di dalam bahan tersebut masih terdapat gugus-gugus fungsi benzena, asam benzoat, hidroksil, karbon alifatik, dengan berat molekul yang masih besar. Dengan demikian proses biodegradasi LAS hingga tercapai waktu paruh hanya terjadi pada rantai karbon alifatik, belum sampai pada tahap pembukaan cincin aromatik.

5. Daftar Pustaka

- AISE & CESIO, 1999. Anaerobic Biodegradation of Surfactant, *Review of Scientific Information*, CEFIC, Brussels, Belgium.
- Botsford J. L 1996. Reduction of Tetrazolium Dye by *Rhizobium meliloti*: A possible assay for toxic chemical, *Can. Jour. Microbial.*, Submitted
- Chhabra, R.S, et al, 1996. Linear Alkylbenzenesulfonates and Related Compounds, International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.
- Folke J., and Landner L., 2000. Risk Assessment of LAS in Sewage and Soil. *European Environmental Research Group Inc.* Stockholm, ed. 3.5, doc. no. 20002.
- Fujita M., & Ike M., 1994. Wastewater treatment using genetically engineered microorganisms, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA.
- Locher H. H., 1991. Bacterial Degradation of p-ToluenSulfonate and Related Aromatic Sulfonic Acid; Characterization of Degradative Pathways and Enzymes, *Ph. D. Thesis, Diss. ETH Nr.9434*, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2000
- Widodo A., 2001. Studi Pendahuluan Pemanfaatan Mikroorganisme Tanah untuk Mendegradasi Senyawa 2,4-diklorofenol, Skripsi.

Pembuatan Membran Selulosa Asetat dari Pulp Abaka (*Musa textilis*)

C.L. Radiman¹⁾ dan S. Wafiroh²⁾

1) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia
e-mail: cynthia@mail.chem.itb.ac.id / cynthia_radiman@yahoo.com

2) Jurusan Kimia, Universitas Airlangga
Kampus C, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia
e-mail: sitiwafiroh@yahoo.com

Abstrak

Perkembangan teknologi membran di Indonesia tidak sepesat di negara lain karena kelangkaan membran sebagai produk lokal. Untuk itu perlu dilakukan upaya pemanfaatan kekayaan alam Indonesia sebagai bahan baku membran. Pulp abaka (*Musa textilis*) yang sudah diputihkan merupakan salah satu sumber selulosa dari bahan nonkayu (*nonwood*) yang telah dimanfaatkan dalam penelitian ini untuk pembuatan membran selulosa asetat. Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu asetilasi pulp abaka, pembuatan membran selulosa asetat dan karakterisasi membran. Proses asetilasi dengan asam asetat dan asam sulfat sebagai katalis menghasilkan selulosa asetat dengan kadar asetil 40,23 %. Spektrum FTIR membuktikan adanya puncak serapan gugus asetil yang khas pada 1238 cm⁻¹. Berbagai analisa telah dilakukan yaitu penentuan massa molekul relatif rata-rata viskositas, kadar asetil dan derajat kristalinitas. Pembuatan membran mikrofiltrasi dilakukan dengan metoda inversi fasa dan pengendapan secara pencelupan. Komposisi optimal yang diperoleh adalah 14 % (b/b) selulosa asetat, 78 % (b/b) aseton dan 8 % (b/b) formamida. Hasil karakterisasi membran pada tekanan 2 kg/cm² menunjukkan fluks air sebesar 39,2 L/m².h dan koefisien rejeksi sebesar 99,3 % terhadap dekstran T-2000. Membran yang dibuat dari selulosa asetat komersial dengan komposisi yang sama ternyata mempunyai fluks air sebesar 2,8 L/m².h dan koefisien rejeksi sebesar 99,6 % terhadap dekstran T-2000. Perbedaan fluks yang sangat besar disebabkan oleh perbedaan massa molekul ke dua jenis selulosa asetat, yang mengakibatkan perbedaan kerapatan pori membran seperti yang ditunjukkan oleh SEM. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa abaka dapat dimanfaatkan sebagai bahan membran yang potensial.

Kata kunci: abaka, selulosa asetat, membran mikrofiltrasi, *Musa textilis*

1. Pendahuluan

Teknologi membran banyak dipakai di industri karena efisiensi pemisahannya yang tinggi, tidak merusak struktur senyawa yang dipisahkan dan dapat dilakukan pada temperatur rendah. Sayangnya aplikasi teknologi ini masih sangat terbatas di Indonesia karena ketersediaan membran menjadi masalah utama. Salah satu jenis membran yang banyak dipakai adalah selulosa asetat yang dapat diperoleh dari asetilasi selulosa. Mengingat Indonesia kaya akan bahan alam yang

mengandung selulosa, upaya untuk menggali potensi itu sebagai bahan baku membran telah dilakukan dalam penelitian ini. Menurut Basta (2003), penelitian mengenai penggunaan bahan baku non-kayu (*nonwood*) sebagai bahan membran masih sangat sedikit. Karena itu dalam penelitian ini dikaji salah satu tanaman non-kayu yang mudah tumbuh di Indonesia dan mengandung kadar holoselulosa 86 %, yaitu Abaka (*Musa textilis*). Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu asetilasi pulp abaka, pembuatan membran selulosa asetat dan

karakterisasi membran. Proses asetilasi dilakukan dengan asam asetat dan asam sulfat sebagai katalis dan hasil yang diperoleh dikarakterisasi dengan analisa gugus fungsi, penentuan massa molekul relatif rata-rata viskositas, kadar asetil dan derajat kristalinitas. Pembuatan membran mikrofiltrasi dilakukan dengan cara inversi fasa. Kualitas membran yang dihasilkan dibandingkan dengan membran yang dibuat dari selulosa asetat komersial dengan komposisi yang sama.

2. Percobaan

2.1. Bahan yang digunakan

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap yaitu asetilasi pulp abaka, pembuatan membran selulosa asetat dan karakterisasi membran. Kecuali dekstran yang diperoleh dari Pharmacia Fine Chemicals, semua zat kimia yang digunakan berasal dari Merck. Untuk proses asetilasi digunakan asam asetat glasial, anhidrida asetat dan asam sulfat pekat. Untuk pembuatan membran digunakan formamida dan aseton, sedangkan untuk karakterisasi membran digunakan dekstran T-10, T-40, T-70, T-500 dan T-2000. Untuk penentuan kadar dekstran digunakan asam sulfat pekat dan fenol. Sebagai pembanding digunakan selulosa asetat komersial yang diperoleh dari Brataco.

2.2. Alat yang digunakan

Alat yang digunakan adalah berbagai peralatan gelas, antara lain viskometer Ostwald 150 dan peralatan lain seperti spektrofotometer FTIR Perkin Elmer, Spectronic-20, SEM (*Scanning Electron Micrograph*) Jeol JSM 35 C, XRD Diano 2100 E, dan sel berpengaduk (*stirred-cell*)

2.3. Pembuatan Selulosa Asetat

Ke dalam labu Erlenmeyer dicampurkan 10 g pulp Abaka yang sudah diputihkan dan 24 mL asam asetat glasial dan diaduk pada 40 °C selama 1 jam, kemudian ditambahkan 60 mL asam asetat glasial dan 0,09 mL asam sulfat pekat dan diaduk lagi selama 45 menit pada temperatur yang sama. Campuran didinginkan sampai 18 °C dan ditambahkan 27 mL anhidrida asetat yang sudah didinginkan pada 16 °C. Selanjutnya ditambahkan 0,6 mL asam sulfat pekat dan 60 mL asam asetat glasial dan diaduk selama 3,5 jam pada 40 °C. Kemudian ditambahkan 30 mL asam asetat 67 % (b/b) setetes demi setetes selama 2 jam pada 40 °C dan diaduk lagi selama 20 jam pada temperatur kamar. Larutan selulosa asetat yang diperoleh

diendapkan dengan air dan endapan yang diperoleh disaring, dicuci sampai netral dan dikeringkan dalam oven pada 60-70 °C.

2.4. Penentuan Kadar Asetil Selulosa Asetat

Sejumlah 1 g selulosa asetat dikeringkan pada 100 °C selama 7 jam dan didinginkan dalam desikator. Kemudian dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer bertutup dan ditambahkan 40 mL etanol. Campuran kemudian dipanaskan pada 60 °C selama 30 menit dan ditambahkan 40 mL NaOH 0,5 M. Pemanasan dilanjutkan pada temperatur yang sama selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada temperatur ruang selama 3 hari dalam keadaan tertutup. Setelah itu dititrisi dengan larutan HCl 0,5 M dengan indikator fenolftalein sampai warna merah muda hilang. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl 0,5 M dan dibiarkan 24 jam; setelah itu campuran dititrisi dengan NaOH 0,5 M dengan indikator fenolftalein. Kadar asetil ditentukan dari persamaan:

% asetil = $[(D-C)M_a + (A-B)M_b] \times 4,305/W$
dengan:

A = volum NaOH yang diperlukan untuk titrasi sampel

B = volum NaOH yang diperlukan untuk titrasi blanko

M_b = molaritas NaOH

C = volum HCl yang diperlukan untuk titrasi sampel

D = volum HCl yang diperlukan untuk titrasi blanko

M_a = molaritas HCl

W = berat sampel (g)

2.5. Karakterisasi Selulosa Asetat

Analisa gugus fungsi dilakukan dengan spektroskopi FTIR dengan sampel pelet KBr dan derajat kristalinitas diukur dengan difraktometer sinar X. Penentuan massa molekul relatif rata-rata viskositas (M_v) ditentukan dari pengukuran viskositas berbagai larutan selulosa asetat dalam aseton dan persamaan Mark-Houwink $[\eta] = K \times M_v^a$ dengan nilai $K = 1,33 \times 10^{-3}$ dan $a = 0,616$

2.6. Pembuatan Membran Selulosa Asetat

Membran datar dibuat dengan metoda inversi fasa yang dikembangkan oleh Loeb dan Sourirajan dengan prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya (Radiman (1998)).

Variasi komposisi larutan cetak yang terdiri dari selulosa asetat sebagai polimer, aseton sebagai pelarut dan formamida sebagai aditif dapat dilihat pada Tabel 2.

2.7. Karakterisasi Membran Selulosa Asetat

Dua parameter utama yang menentukan kinerja suatu membran adalah permeabilitas dan permselektivitas. Permeabilitas yang dinyatakan sebagai fluks menggambarkan kecepatan aliran permeat yang melalui membran, sedangkan permselektivitas yang dinyatakan sebagai koefisien rejeksi (R) menggambarkan kemampuan membran untuk menahan spesi kimia tertentu. Prosedur rinci penentuan fluks dan koefisien rejeksi telah diuraikan sebelumnya (Radiman (1998)). Tekanan operasional yang digunakan adalah 2 kg/cm² dan pengukuran dilakukan dengan sel

berpengaduk.

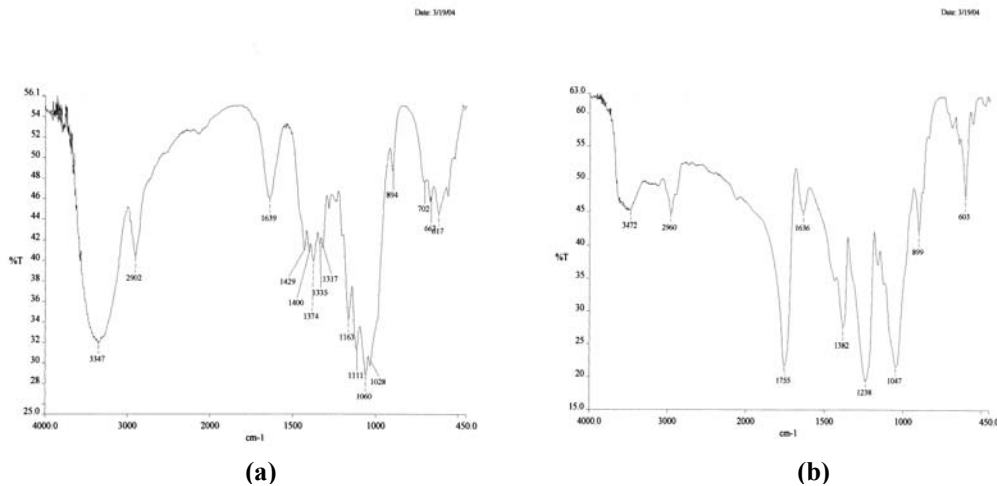
3. Hasil dan pembahasan

3.1. Analisa Gugus Fungsi pada Selulosa dan Selulosa Asetat dengan FTIR

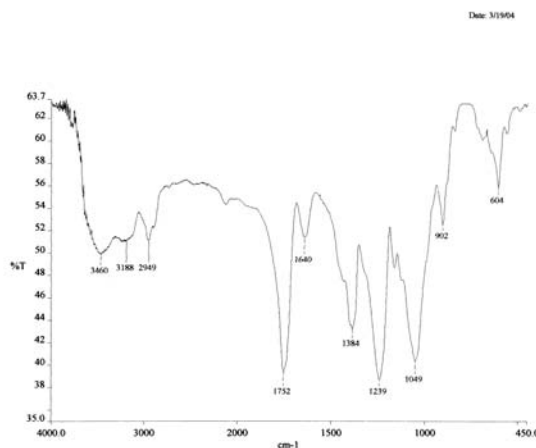
Gambar 1 menunjukkan spektrum FTIR selulosa dan selulosa asetat dari abaka. Timbulnya puncak serapan pada 1755 cm⁻¹ sebagai ciri gugus C=O ulur dan pada 1238 cm⁻¹ sebagai ciri gugus C-O asetil membuktikan adanya gugus asetat pada hasil asetilasi pulp Abaka. Spektrum serapan selulosa asetat Abaka yang ditunjukkan pada Gambar 1b relatif sama dengan spektrum serapan selulosa asetat komersial yang diperlihatkan pada Gambar 2.

3.2. Karakteristik Selulosa Asetat Abaka dan Selulosa Asetat Komersial

Tabel 1 menunjukkan karakteristik selulosa asetat yang dihasilkan dari tumbuhan Abaka



Gambar 1. Spektrum FTIR dari (a) selulosa Abaka (b) selulosa asetat Abaka



Gambar 2. Spektrum FTIR selulosa asetat komersial

dan selulosa asetat komersial. Penentuan kadar asetil berguna untuk menentukan jenis selulosa asetat yang diperoleh dari asetilasi. Selulosa monoasetat mempunyai kadar asetil kurang dari 35 %(b/b), selulosa diasetat 35-43,5 %(b/b) sedangkan selulosa triasetat 43,5-44,8 %(b/b). Permeabilitas membran yang dihasilkan sangat tergantung pada derajat asetilasi selulosa asetat. Baker (2000) menyatakan bahwa membran selulosa asetat komersial umumnya mempunyai kadar asetil sebesar 40 %(b/b) yang merupakan karakteristik selulosa diasetat. Hasil karakterisasi ini menunjukkan bahwa kondisi asetilasi yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan selulosa diasetat yang layak dipakai untuk proses pemisahan dengan membran, karena nilainya yang tidak jauh

berbeda dengan selulosa asetat komersial. Hasil penentuan massa molekul relatif rata-rata viskositas (M_v) menunjukkan bahwa selulosa asetat Abaka mempunyai rantai polimer yang lebih pendek dibandingkan selulosa asetat komersial. Hasil ini didukung oleh nilai derajat kristalinitas selulosa asetat Abaka yang sedikit lebih rendah dibandingkan selulosa asetat komersial.

3.3. Pengaruh Komposisi Larutan Cetak terhadap Kualitas Membran Selulosa Asetat Abaka

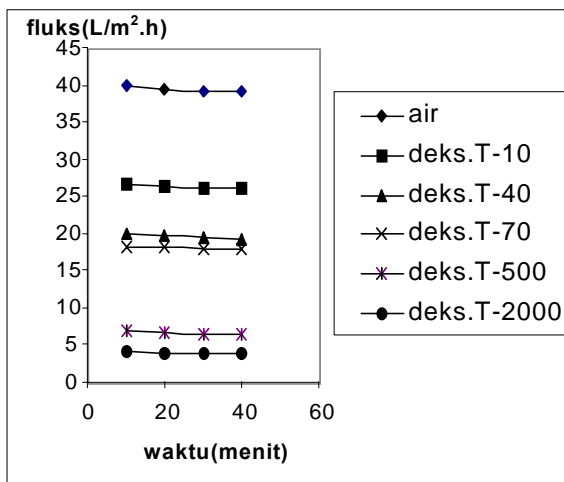
Komposisi larutan cetak sangat menentukan kualitas membran yang dihasilkan. Seperti ditunjukkan pada Tabel 2, diperlukan konsentrasi selulosa asetat minimal untuk mendapatkan membran dengan sifat mekanik

Tabel 1. Perbandingan karakteristik selulosa asetat Abaka dan selulosa asetat komersial

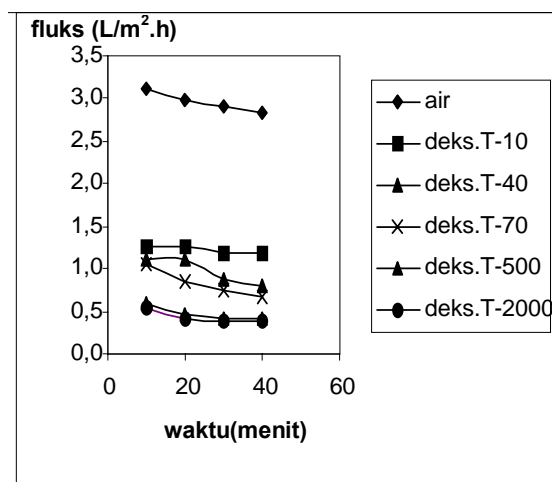
Parameter	Selulosa Asetat Abaka	Selulosa Asetat komersial
Kadar asetil (% b/b)	40,23	40,40
Massa molekul (M_v)	$4,54 \times 10^4$	$7,59 \times 10^4$
Derajat kristalinitas (%)	14,9	15,7

Tabel 2. Kualitas fisik membran secara kualitatif dari berbagai komposisi larutan cetak

Selulosa Asetat (% b/b)	Aseton (% b/b)	Formamida (% b/b)	Kualitas membran
12	76	12	Membran sangat rapuh
12	78	10	Membran rapuh
12	80	8	Membran agak rapuh
14	78	8	Membran tidak rapuh



(a)



(b)

Gambar 3. Permeabilitas air dan dekstran (a) membran selulosa aseta Abaka dan (b) membran selulosa asetat komersial

Tabel 3. Koefisien rejeksi membran selulosa asetat Abaka dan membran selulosa asetat komersial

Jenis Dekstran (T-p*)	R (%)	
	Membran Abaka	Membran komersial
T-10	71,3	71,6
T-40	85,7	87,7
T-70	92,5	93,4
T-500	98,3	98,6
T-2000	99,3	99,6

* M_n dekstran T-p = $p \times 10^3$

yang sesuai untuk proses pemisahan yang memerlukan tekanan sebagai gaya dorong. Komposisi optimal diperoleh pada 14% (b/b) selulosa asetat, 78% (b/b) aseton dan 8% (b/b) formamida.

3.4. Karakteristik Membran Selulosa Asetat Abaka dan Membran Selulosa Asetat Komersial

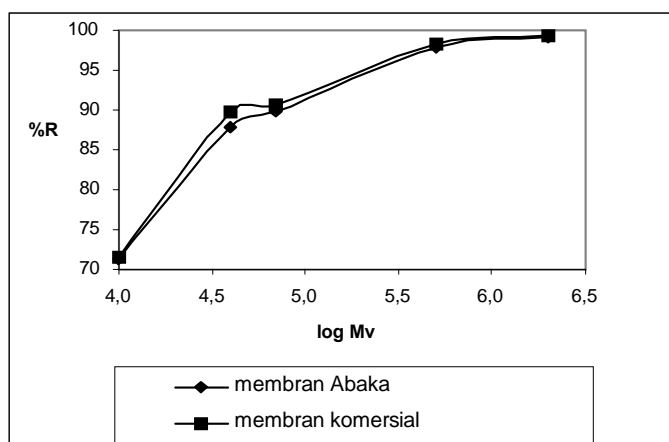
Gambar 3 menunjukkan bahwa fluks air dan larutan dekstran dari membran selulosa asetat Abaka jauh lebih tinggi dari fluks air dari membran selulosa asetat komersial. Fakta ini mengindikasikan bahwa membran komersial lebih rapat dibandingkan dengan membran Abaka. Mengingat bahwa komposisi larutan cetak ke dua jenis membran tersebut sama, maka panjang rantai polimer menjadi salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kerapatan membran. Hal ini didukung dari data pada Tabel 1 yang memperlihatkan bahwa rantai polimer selulosa asetat komersial 1,7 kali lebih panjang daripada Abaka.

Tabel 3 menunjukkan perbandingan koefisien rejeksi membran selulosa asetat Abaka dan komersial terhadap larutan dekstran dengan massa molekul relatif rata-rata jumlah yang

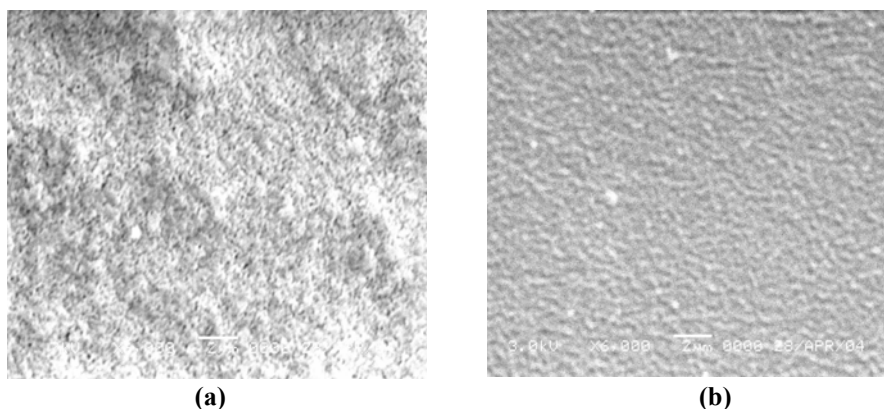
bervariasi antara 1×10^4 hingga 2×10^6 . Secara umum dapat disimpulkan bahwa koefisien rejeksi membran selulosa asetat komersial lebih tinggi dari Abaka walaupun perbedaannya sangat kecil.

Selektivitas membran dicirikan oleh nilai *molecular weight cut off* (MWCO) yang menggambarkan bahwa spesi dengan massa molekul relatif rata-rata jumlah sama dengan MWCO dapat ditahan oleh membran dengan koefisien rejeksi sebesar 90 %. Dari Gambar 4 terlihat bahwa nilai MWCO membran selulosa asetat Abaka dan komersial tidak jauh berbeda, yaitu $7,08 \times 10^4$ untuk membran selulosa asetat Abaka dan $6,31 \times 10^4$ untuk membran selulosa asetat komersial. Hal ini menunjukkan bahwa ukuran pori membran Abaka sedikit lebih besar dari membran komersial. Bentuk kurva yang landai menunjukkan bahwa distribusi ukuran pori pada ke dua jenis membran tersebut cukup lebar.

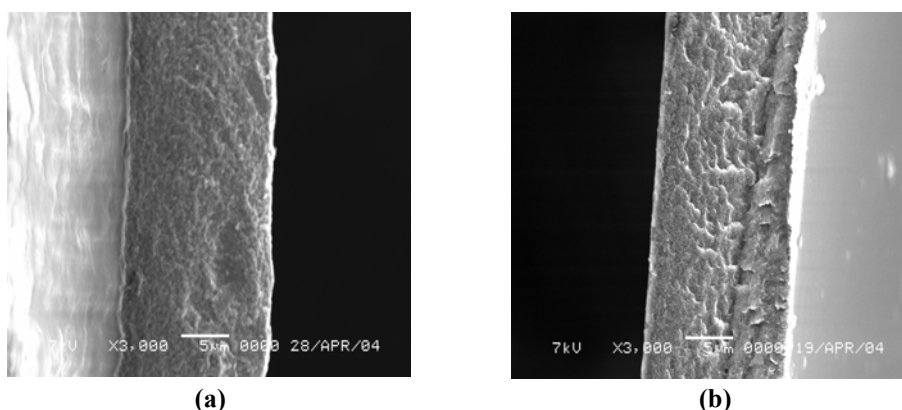
Gambar 5 menunjukkan foto SEM (*Scanning Electron Micrograph*) permukaan membran selulosa asetat Abaka dan komersial, Dari foto permukaan membran tampak bahwa membran selulosa asetat Abaka mempunyai ukuran pori



Gambar 4. MWCO membran selulosa asetat Abaka dan membran selulosa asetat komersial



Gambar 5. Foto SEM permukaan (a) membran selulosa asetat Abaka dan (b) membran selulosa asetat komersial



Gambar 6. Foto SEM penampang lintang (a) membran selulosa asetat Abaka dan (b) membran selulosa asetat komersial

yang lebih besar dibandingkan yang komersial.

Hal ini mendukung hasil karakterisasi fluks membran Abaka yang jauh lebih tinggi dari membran komersial. Seperti diketahui, mekanisme pembuatan membran dengan metoda inversi fasa dan pengendapan secara pencelupan melibatkan proses perubahan dari fasa cair ke fasa padat yang diawali dengan transisi dari satu keadaan cair ke dua keadaan cair atau *liquid-liquid demixing* (Radiman (2002)). Sesuai dengan hasil penelitian Loske *et al* (2003), morfologi membran sangat dipengaruhi oleh M_v selulosa asetat yang digunakan, karena parameter tersebut menentukan lintasan yang dilalui selama proses *demixing* tersebut. Penampang lintang kedua membran yang ditunjukkan pada Gambar 6 menunjukkan adanya struktur pori yang simetris sepanjang arah tebal membran yang merupakan ciri khas dari membran selulosa asetat.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa abaka dapat dimanfaatkan sebagai bahan membran yang potensial. Komposisi optimal yang diperoleh untuk pembuatan membran mikrofiltrasi adalah selulosa asetat 14 %(b/b), aseton 78 %(b/b) dan formamida 8 %(b/b). Permeabilitas membran selulosa asetat dari Abaka ternyata jauh lebih tinggi dari membran selulosa asetat komersial. Hasil karakterisasi membran selulosa asetat Abaka pada tekanan 2 kg/cm² menunjukkan fluks air sebesar 39,2 L/m².h. dan koefisien rejeksi sebesar 99,3 % terhadap dextran T-2000. Dengan komposisi yang sama ternyata membran komersial mempunyai fluks air sebesar 2,8 L/m².h. dan koefisien rejeksi sebesar 99,6 % terhadap dextran T-2000. Perbedaan fluks yang sangat besar disebabkan oleh perbedaan massa molekul ke dua jenis selulosa asetat tersebut yang mempengaruhi kerapatan pori pada permukaan membran.

5. Ucapan terima kasih

Tim peneliti menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset Dan Teknologi Republik Indonesia yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini melalui Riset Unggulan Terpadu X.

6. Daftar Pustaka

Baker R.W. (2000), *Membrane Technology and Applications*, Mc.Graw-Hill, New York, hal. 194-196.

Basta A.H., El-Saied H. and Elberry M. (2003), Cellulose Membranes for Reverse Osmosis. Part II. Improving RO membranes prepared from non-woody cellulose, *Desalination*, **159**, 183 – 196.

Loske S., do Carmo Goncalves and Wolf B.A. (2003), Fractionation of cellulose acetate for the investigation of molecular weight influences on the morphology of membranes, *J. Memb. Sci.*, **214**, 223-228.

Radiman C.L., (1998), Pengaruh komposisi koagulan terhadap karakteristik membran polisulfon, *Malaysian J. Anal. Sci.*, **4**(2), 214-220.

Radiman C.L. dan Suendo V. (2002), Perkembangan Sains dan Teknologi Membran, Prosiding Seminar Kimia Bersama UKM-ITB ke-5, Melaka, 16-17 Julai 2002, jilid I, halaman 15-22.



Proceeding of The 6th ITB Joint Seminar on Chemistry



Synthesis of New Chiral 2-Substituted 1,3-Benzoxazin-4-One and its Applications in Asymmetric Synthesis

C. Ciptati* and Patrick Perlmutter.**

*Department of Chemistry, Institute of Technology Bandung, Jl Ganesha 10 Bandung, Indonesia

**School of Chemistry, Monash University, P.O. Box 23, Victoria-3800, Australia

Abstract

2-Substituted 1,3-benzoxazin-4-ones has been investigated as new chiral auxiliaries. Racemic 2-(9-Anthracenyl)-1,3-benzoxazin-4-one as well as 2-((2,6)-dichlorophenyl)-1,3-benzoxazin-4-one has been shown to induce excellent diastereoselectivity when used as an auxiliary in aldol reactions. Details of the synthesis and first application of these new auxiliaries will be presented.

Paper is not available

Mechanical Performance of Natural Fiber Reinforced Polyester Composites from Glycolysed PET Waste

D. R. Abu Bakar¹, I. Ahmad^{1,*}, A. Ramli²

¹School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi 43600, Selangor, Malaysia.

*Corresponding author: Tel: 603-89215431; Fax: 603-89215410;

E-mail: gading@pkriscc.chem.ukm.my

²Advanced Materials Centre SIRIM Berhad, Lot 34, Jalan Hi-Tech 2/3, Kulim Hi-Tech Park, Kulim 09000, Kedah, Malaysia.

Abstract

This paper reports on a new attempt for direct incorporation of natural fibre into a thermosetting matrix resin to produce natural fibre/polyester composites comprising of unsaturated polyester resin synthesized from glycolysed PET waste and kenaf fibre. The mechanical properties (tensile and flexural properties, impact strength and hardness) of kenaf/polyester composites, with respect to its fiber content, up to 10% by volume and thermal degradation (TGA) are presented. Mechanical properties such as tensile strength and flexural strength increase with the increment of fibre content as a result of reinforcement with kenaf fibre, reaching optimum values at about 7.5% (v/v) fibre. It was found that the mechanical performance of the kenaf/polyester composites gave satisfactory results, hence showed the potential of this composite in a number of applications.

Keywords: *Glycolysis, PET waste, PET recycling, polyester composites.*

1. Introduction

Plastics have become an indispensable part of modern life. Poly(ethylene terephthalate) (PET) is one of the most valuable versatile engineering plastics which is used to manufacture for packaging mainly mineral water and soft drink bottles. With increasing application and decreasing prices, plastics became the symbol of disposability in consumerism and hence a noxious material of concern in the relatively recent environmental protection issues and economic benefits. Therefore, the necessity of finding a simple economic route for the recycling of PET waste is an important practice for sustainable recycling and contributes to the conservation of raw petrochemical products and energy. One of the ways to accomplish this is through chemical recycling such as methanolysis, glycolysis, hydrolysis, aminolysis and ammonolysis [1], giving a wide variety of specialized products. Most of the past research

concerned focused in the utilization of the product (unsaturated polyester resin, polyurethane foam, polymer concrete, coating resin and polymer composites with reinforcements) [2-7] when glycolysis is used.

Recently a new attempt for direct incorporation of natural fibre into a thermosetting matrix resin to produce natural fibre/polyester composites comprising of unsaturated polyester resin synthesized from recycled PET as a more environmentally friendly composite was done and found successful. Kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) a new cultivated fibre crop in Malaysia is used as reinforcing fibre as it exhibit excellent physical and mechanical properties, light weight, relatively cheap, obtained from renewable resources and the fact that it can be utilize to produce very cost effective composite material, replacing synthetic ones that are most commonly used.

2. Experimental

Unsaturated Polyester Resin Synthesis

The preparation of unsaturated polyester resin is based on the esterified glycolysed product of PET with maleic anhydride and ethylene glycol. The resin was first prepared by reacting the post-consumer PET soft drink bottles (washed, dried, grind) and ethylene glycol through glycolysis in a four-necked round bottom flask of 1 L capacity, together with zinc acetate (0.5% based on weight of PET) as catalyst under reflux in nitrogen atmosphere at 180-190 °C for 7 hrs. This is followed by a polyesterification step between the glycolysed product and maleic anhydride at 190-210 °C for 4 hrs. Later, the liquid resin is allowed to cool down to 120 °C and 0.45% of PET weight of hydroquinone added to prevent pre-mature curing. At 70 °C, the resin was intermixed with 30% (w/w) styrene. Chemicals and solvents are of analar grade and are used without further purification.

Natural fibre (kenaf)

A bast fiber type taken from kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) was cultivated and supplied by the National Kenaf Research and Development Project, Rice and Industrial Crops Centre, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI). The fibres, being washed and dried were cut to a ~6mm of length. To avoid fibres from aggregating, which further leads to non-homogenous fibre distribution into the composite, the fibres are sieved on a 1 mm grid sieve.

Composite processing

The resin were mixed with cobalt octoate (accelerator) and methyl ethyl ketone peroxide/MEKP (catalyst) at a ratio of resin : MEKP : cobalt octoate of 100 : 1.5 : 0.5 and thoroughly mixed. The fibres were dried in an oven at 100 °C for 6 h prior to use, and were added to the resin and mixed with a mechanical stirrer for 30 min followed by pouring it into aluminium mold castings (~3 mm thickness). The working surface is polished and a mold-releasing agent is applied on the surface. All samples were cured at 60 °C for 16 hrs and post cured at 100 °C for another 2 hrs. The demoulded sheets were trimmed and saw cut for further testing.

Testing

Tensile testing of the specimens has been carried out using an Istron 5567 as per ASTM D-638-91 at a cross-head speed of 5 mm min⁻¹ and a gripping length of 100 mm. Specimens were 100 x 15 x 3 mm in size.

Flexural tests were performed using the same instrument according to ASTM 790-91, under a three-point-bend test. The specimens were 125 x 12.5 x 3 mm in size. A span of 75 mm was employed, maintaining a 2.5 mm min⁻¹ and a span-to-depth ratio of 16:1.

Impact test were performed using an impactometer (Ceast 6545/0000, Italy) in accordance with ASTM 256-90b. The specimens, sized 62.5 x 12.5 x 3 mm were unnotched as introducing a notch to the sample will result in further cracking to the notch area. The impact strength was calculated by dividing the energy in kJ recorded on the tester with the cross-sectional area of the sample. All the results are taken as the average of 5 samples of each testing.

Hardness measurements were taken as in ASTM D 2240-91 using Shore Scale D Durometer.

Thermogravimetric analysis (TGA) measurement were performed under atmospheric conditions with a Mettler Toledo type instrument at a heating rate of 10 °C min⁻¹ and sample weights in the range of 5-10 mg.

3. Results and Discussion

The performance of the obtained material composite in tensile strength and tensile modulus is presented in figure 1 and figure 2 respectively. Although the formation of entrapped gas is hard to be avoided during curing, the mechanical properties of the specimens were acceptable. The both measured tensile strength and modulus are with the kenaf fibre loading in the synthesized resin matrix, varied from 0 to 10% (v/v). This low volume fraction is due to the high surface tension of the synthesized resin and the aspect ratio of the fibre itself.

The synthesized resin alone (without fibre) showed a tensile strength of about 24.7 MPa. While with the addition of about 7.5% (v/v) fibre, tensile strength improved to about 22.2% at 30.2 MPa. As accordingly to the general rule of mixtures, the mechanical properties of the

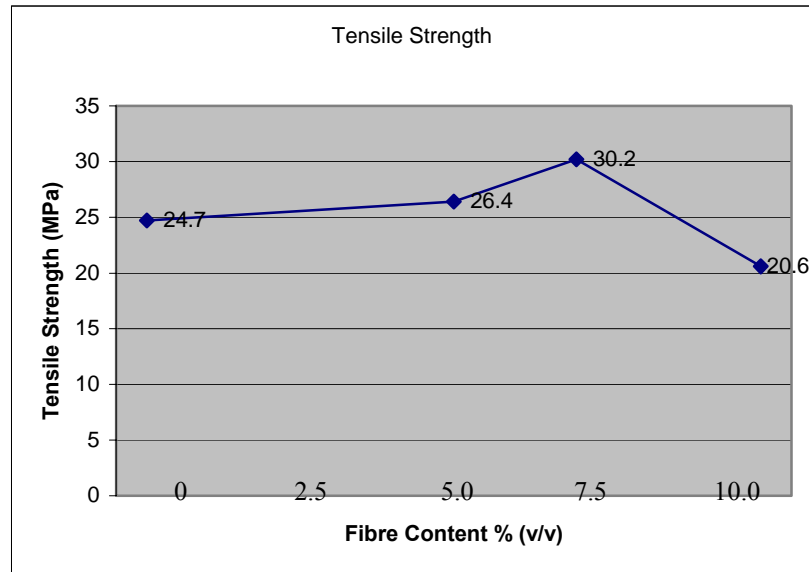


Figure 1: Effects of filler loadings on the tensile strength.

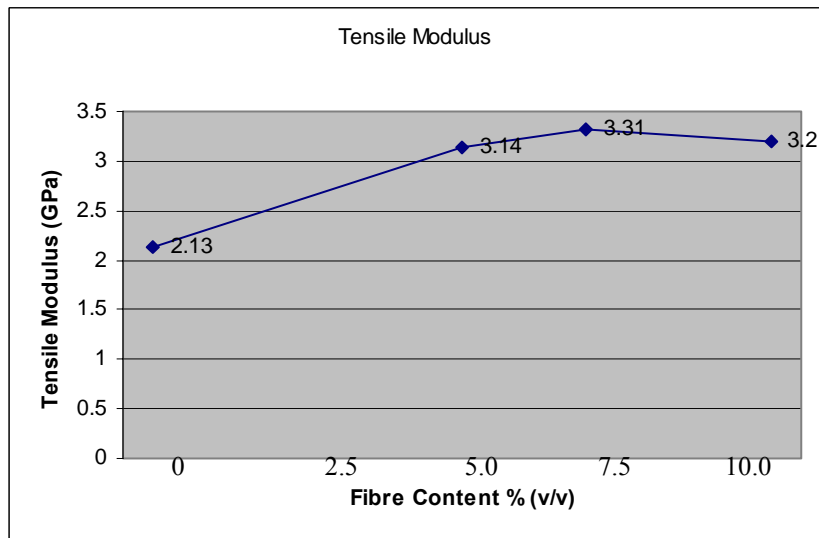


Figure 2: Effects of filler loadings on tensile modulus

synthesized unsaturated polyester resin composite reinforced with kenaf fibre improved with increase of fibre content. Further increment in the fibre content however to about 10% (v/v) decreases the tensile strength by about 31.7%. Such decreases trend in properties could have been associated to a poor dispersion due to agglomeration when the fibre volume content is higher than 7.5%. Tensile modulus showed the highest at 7.5% (v/v) fibre, which is about 3.3 GPa

Similarly, an increasing strength up to an optimum value followed by a decreasing value is also observed from the flexural strength of the composites as demonstrated in figure 3. In a

three-point-bending test, flexural strength is equal to the maximum stress in the outer fibres at the moment of break. At 5% (v/v) of fibre loading, the flexural strength of the composite is found to be 41 MPa. Increasing the fibre content to 7.5% (v/v) gives an increase to the flexural strength to about 65.9% at 68 MPa. Again, by adding fibre to about 10% (v/v) decreases the flexural strength by about 30.9%. The decreasing trend observed may due to the presence of so many fibre ends in the composite and this could later on initiate cracking and therefore, potential composite failure.

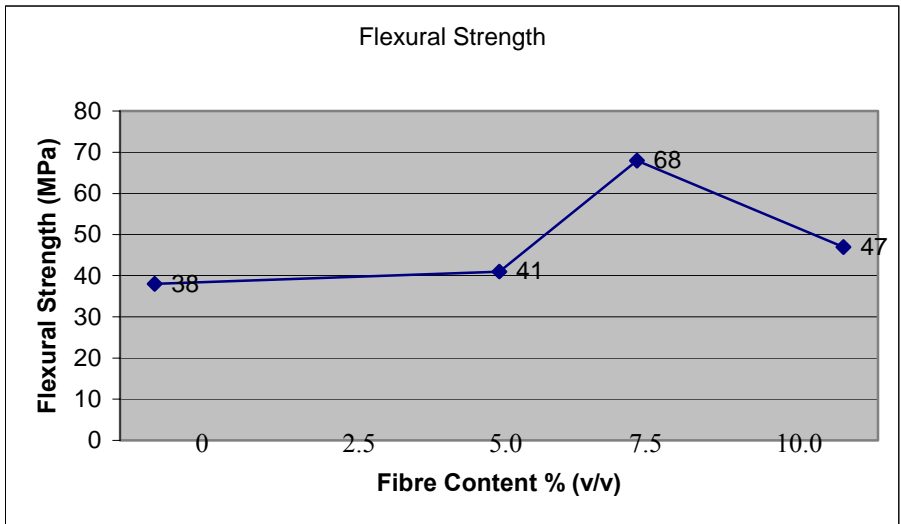


Figure 3: Effects of filler loadings on flexural strength

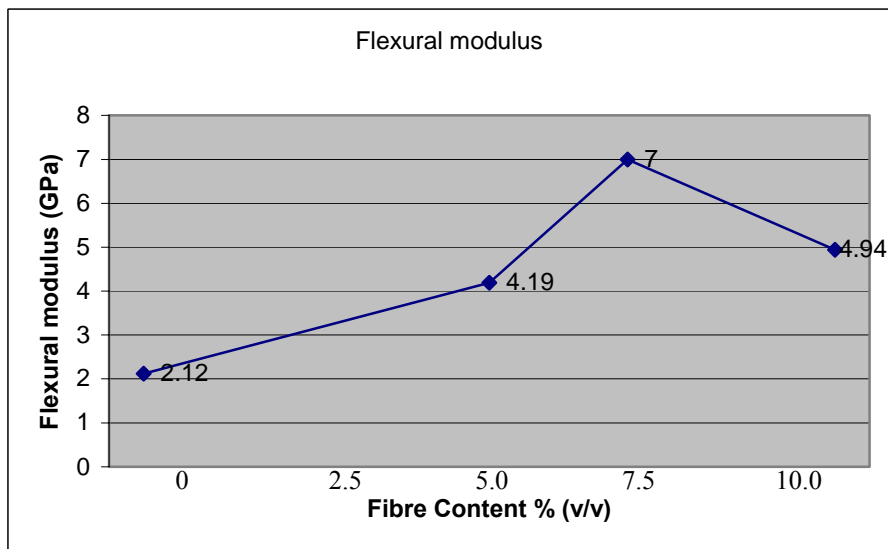


Figure 4 : Effects of filler loadings on flexural modulus

The flexural modulus results as shown in figure 4 were comparatively higher than the corresponding tensile modulus. At a similar fibre content of 7.5% (v/v), the flexural modulus showed the highest at about 7 GPa. The optimum fibre content varies with the nature of both fibre (chemical and structural composition, fibre type etc.) and matrix (chemical structure, surface tension, hydrophobicity with respond to the hydrophylicity of natural fibre etc.), fibre aspect ratio, fibre/matrix interaction (interfacial bonding etc.) and under a similar operative condition, it can be said that the above composite having around 7-8% (v/v) kenaf fibre reached optimum mechanical properties.

The variation of kenaf loading with its impact strength is as shown in figure 5. The impact strength of neat polyester is shown as 4.23 kJ m⁻² and increased steadily i.e. 4.35-4.48 kJ m⁻² as the fibre loading increases. It can be observed that at low fiber content (5%) the impact strength decreases slightly and then increases for higher fibre content. This decrease may due to the dilution factor where the ratio of the fibre is too small with respect to its matrix, thus causing the fibre to be localized at certain points in the composite. Hence, at a higher fibre loading, the fibre gets a better distribution and as a result, increase in impact strength. Hardness (Shore D) of the composites is as presented in figure 6.

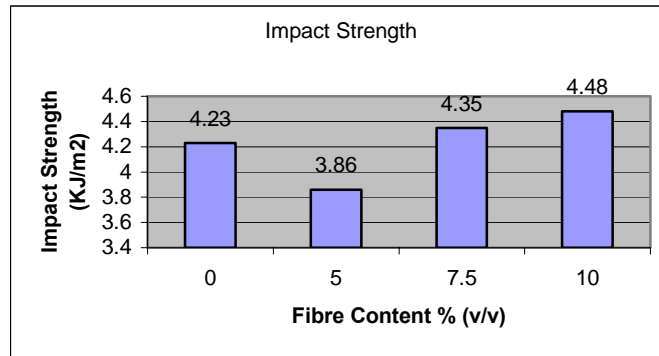


Figure 5: Effects of filler loadings on impact strength

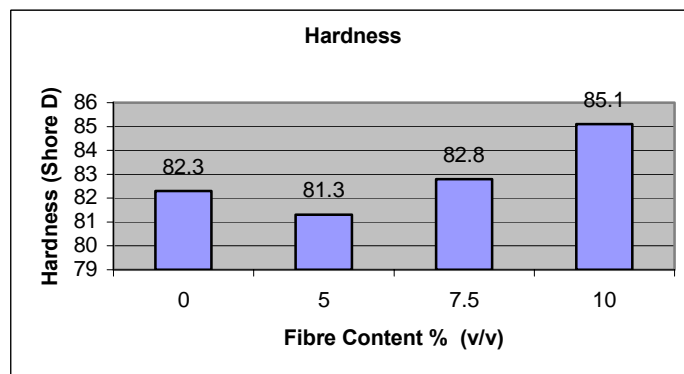


Figure 6 : Effects of filler loadings on hardness

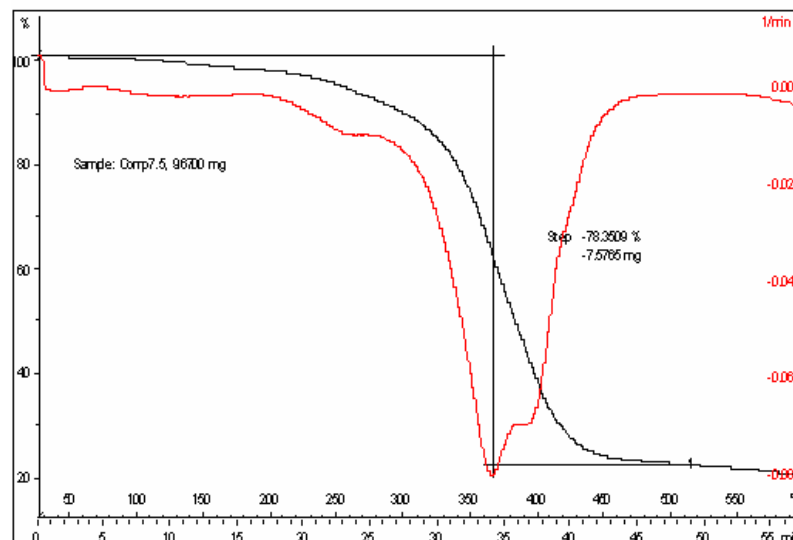


Figure 7 : TGA degradation of the composites having 7.5% kenaf

Thermogravimetric analysis enables us to study the various mass loss caused by a rise in temperature of the samples. The mass of the sample decreases as the temperature increases during degradation. Fig. 7 shows the typical TGA degradation of the composites having

7.5% kenaf which starts at 28 °C and completed at 515 °C.

Table 1 shows the initial decomposition temperature (IDT), decomposition temperature at 50% of weight loss ($T_{50\%}$), final decomposition temperature (FDT) and total weight loss of the composite.

Table 1: TGA profiles of the composites having 7.5% kenaf

IDT (°C)	T _{50%} (°C)	FDT (°C)	Total weight loss (%)
28	345	515	78.35

4. Conclusion

Recycling of PET waste through glycolysis was successfully performed to obtain unsaturated polyester resin suitable as matrix for natural fiber in a natural fiber reinforced polyester composite. The composite produced properties that are comparable to other natural fibre reinforced thermosets product. In addition, there are numerous potential applications for the composite which include furnishing for interiors, panels and various building application.

5. Acknowledgement

Appreciation is given to the Ministry of Science, Technology and Innovation (MOSTI), Malaysia for providing financial assistance through research grant IRPA 09-02-02-0093-EA237 and also to National Kenaf Research and Development Project, Rice and Industrial Crops Centre, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI) for kindly supplying the fibre. The first author would also like to thank MOSTI for awarding a NSF Scholarship through her program in UKM.

6. References

- [1] Paschun D., Spychaj T., "Chemical Recycling of Poly(ethylene terephthalate)", *Ind. Eng. Chem. Res.* 1997, 36: 1373-1383.
- [2] Vaidya, U. R., Nadkarni, V. M., "Unsaturated polyester resins from PET waste: Synthesis and characterization", *Ind. Eng. Chem.* 1987, 26: 194-198.
- [3] Vaidya, U. R., Nadkarni, V. M., "Polyester Polyols for Polyurethanes from PET Waste: Kinetics of Polycondensation", *J. Appl. Polym. Sci.* 1988, 35: 775-785.
- [4] Rebeiz, K. S., "Precast use of Polymer Concrete using unsaturated polyester resin based on recycled PET waste". *Construction and Building Material* 1996, 10(3): 215-220.
- [5] Kawamura, C., Ito, K., Nishida, R., Yoshihara, I., Numa, N., "Coating Resins synthesized from recycled PET", *Progress in Organic Coatings* 2002, 45: 185-191.
- [6] Aslan S., Immirzi, B., Laurienzo, P., Malinconico, M., Martuscelli, E., Volpe, M. G., Pelino, M., Savini, L., "Unsaturated polyester resins from glycolysed waste polyethyleneterephthalate: synthesis and comparison of properties and performance with virgin resin", *Journal of Material Science* 1997, 32: 2329-2336.
- [7] Radenkov, Ph., Radenkov, M., Grancharov, G., Troev, K., "Direct usage of products of poly(ethylene terephthalate) glycolysis for manufacturing of glass-fibre-reinforced plastics", *European Polymer Journal* 2003, 39: 1223-1228.

The Synthesis of Some Histidine Derivative Compounds Containing Imidazole Ring Framework and the Investigation of Their Inhibitor Activity towards Carbon Steel in 1% NaCl Solution

Deana Wahyuningrum¹⁾, Reza Brahma²⁾, Sadijah Achmad³⁾, and Bambang Ariwahjoedi⁴⁾

^{1), 2), 3)} Laboratorium Kimia Bioorganik/Organik Sintesis, Departemen Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No. 10 Bandung 40132, Indonesia

¹⁾ e-mail: deana@chem.itb.ac.id

⁴⁾ Laboratorium Kimia Fisik Material, Departemen Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No. 10 Bandung 40132, Indonesia

⁴⁾ e-mail: ari@chem.itb.ac.id

Abstract

The compound propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate ester (**1**), 2-amino-N-(2-hydroxyethyl)-3-(1H-imidazol-4-yl)propanamide (**2**), and propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate ester (**3**) have been synthesized from 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoic acid (histidine). The melting point and the chemical yield of compound **1**, **2**, and **3**, respectively, are 236°C – 238°C and 85,79% ; 274°C – 276°C and 45,29%; and 230°C – 232°C and 45,09%. The characterization of compound **1** and **3** using infra red spectroscopy showed the peaks with wavelength number of C=O stretching vibration at 1700 – 1780 cm⁻¹ and stretching vibration of C-O-C at 1000 – 1250 cm⁻¹ significantly for ester group on compound **1** and **3**, which were not shown on infra red spectrum of histidine. The infra red spectrum of compound **2** showed similar peaks of stretching vibration of N-monosubstituted amide at 1630 – 1635 cm⁻¹ and 1515 – 1566 cm⁻¹, and the weak peak of bending vibration of secondary amine at 1490 – 1580 cm⁻¹, with the additional peak of stretching vibration of free primary amine at wavelength number of 3300 – 3500 cm⁻¹, which showed the presence of ethylamine substituent attached to imidazole ring framework. The pH value of compound **1**, **2**, **3**, and histidine are, respectively, 3, 8, 3 and 5. According to the pH value, the compound **2** are having more reasonable potent as corrosion inhibitor than compound **1**, **3** and histidine. This assumption was also confirmed by the measurements of inhibition activity of histidine, compound **1**, **2**, and **3** utilizing tafel Method, which showed the best inhibition activity that belongs to compound **2**, which given 85,79% inhibition activity. The increase in inhibitor concentration, in this study concentration of compound **1**, showed the better inhibition action towards carbon steel in 1% NaCl solution.

Keywords: histidine, imidazole ring framework, corrosion inhibitor, Tafel Method

1. Introduction

The corrosion prevention has always been one of major consideration in the development of design and operational of oilfield mining in the recent time and also in the future (Zhao, *et al.*, 2004; Kanicky, 2001). In Indonesia, the oilfield mining is one of important activities that would give valuable commodity and income to the nation. Meanwhile, in every oilfield mining activities there always been oil transport from the source deep down of the earth to the

reservoir on the ground field through the carbon steel type pipes in order to be processed further, such as fractional distillation and refining each oil fractions. These processes involving quite complex conditions, such as high pressure, extreme temperature, and the impurities (mostly carbon dioxide gas, water vapor, and hydrogen sulfide gas), that have made the effectiveness of conventional corrosion inhibitor, such as pipes coating, decreased. It may lead to the expensiveness of

operational cost of oilfield mining (Hassanzadeh, 2004; Ruschau, 1999; Miksic, 1998). Therefore many studies have been carried to explore more effective and low cost corrosion inhibitor to overcome the high corrosion prevention cost in most of industries, especially oilfield mining (Roberge, 1999; Raicheva, *et.al.*, 1992).

So far there is still a few studies have been taken subjected to the correlation between molecular structure of corrosion inhibitor compounds and their inhibitive performance.^{2, 3} There are several studies involving the effect of nitrogen and sulfur containing compounds towards the inhibition activity (Raicheva, *et.al.*, 1992). According to some literatures, generally there are three chemical groups that having inhibition activity, which are: (i) amine; (ii) nitrogen containing heterocycle compounds; and (iii) sulfur, amide, carbamide containing compounds (Cao, *et.al.*, 2003; Gomma, 1998; Lewis, 1993; Edwards, *et.al.*, 1994). One of nitrogen containing heterocycle compound that has been widely used as commercial inhibitor, especially in minimizing the corrosion process

in oilfield mining that is mainly carbon dioxide induced, is Oleic Imidazoline type corrosion inhibitor (Popova, *et.al.*, 2004; Ramachandran *et.al.*, 1997 and 1996; Edwards, *et.al.*, 1994; Raicheva, *et.al.*, 1992). Some oleic imidazoline derivative compounds have been synthesized in order to determine the inhibition mechanism on metal surface. One of the factors that have made oleic imidazoline type inhibitor having good inhibition activity is the “three big parts” in its structure, which each of them having its own function when interacted with the metal surface (Ramachandran, 1999, 1997, 1996; Edwards, *et.al.*, 1994). Those “three big parts” are: the ‘head’ part, the ‘anchor’ (or ‘pendant’) part, and the ‘tail’ part. The ‘head’ part of oleic imidazoline, which is the imidazoline ring framework, can be attached to the metal surface through the electron pair of nitrogen of imidazoline ring. The ‘anchor’ part is the alkylamine substituent of imidazoline ring that can maintain the adsorption of imidazoline ring on metal surface. The ‘tail’ part of imidazoline is the long hydrophobic alkyl chain as one of substituent of imidazoline ring (Figure 1)

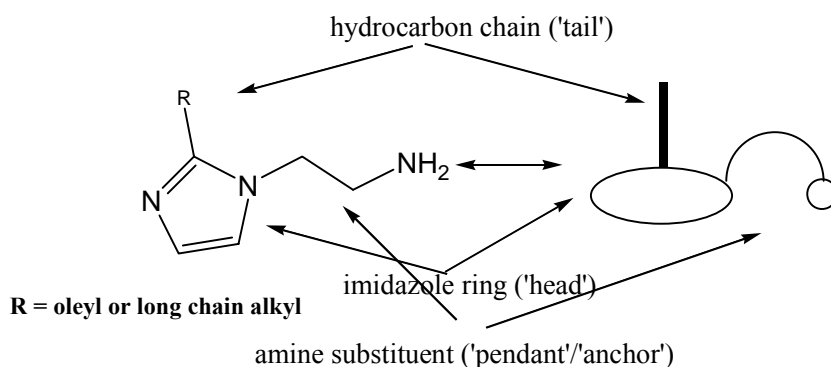


Figure 1. The general structure of imidazoline oleic type corrosion inhibitor

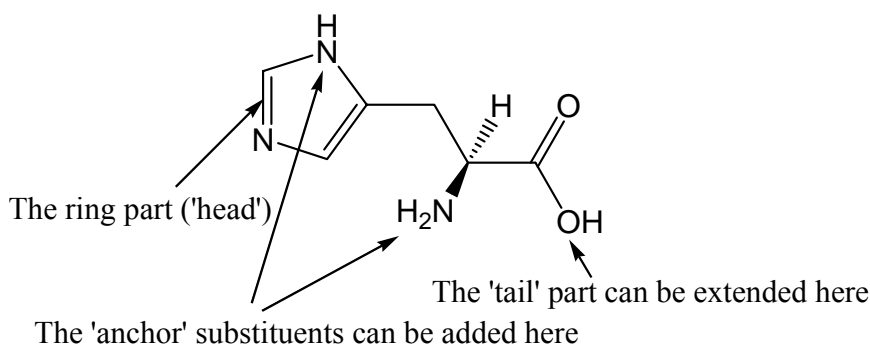


Figure 2. The modification plan of histidine structure

(Edwards, *et.al.*, 1994).

Histidine is one of essential amino acid that is commonly found in plant tissues as part of protein chain. Histidine is a unique amino acid in structure because it contains an imidazole ring framework and other substituents that might perform as corrosion inhibitor. Therefore in this study we chose histidine as main material to be modified in order to gain some of its derivatives that might have corrosion inhibitor potent. The imidazole ring part of histidine might have the same function as the 'head' part of oleic imidazoline type corrosion inhibitor. The amine substituent of histidine can play the role of 'anchor' part of oleic imidazoline, and the carboxylic part of histidine can be extended to become long chain hydrophobic part of corrosion inhibitor (Figure 2), because some studies has proven that the longer the 'tail' part of imidazoline inhibitor, the higher its inhibition activity (Popova, *et.al.*, 2004; Raicheva, *et.al.*, 1992). According to these assumptions, the purpose of this study is to modify the structure of histidine in order to gain some of its derivatives that might have potent as corrosion inhibitor. The investigation of the inhibition activity was performed by Tafel method to understand the correlation between structure of histidine derivatives and their inhibition activity.

2. Experimental

A. General Procedure

All of reagents used in this study are GR grade. All of solvents were distilled before used. The characterization of synthesized products was analyzed using Shimadzu FTIR of Departemen Kimia ITB for the determination of infrared spectrums, and the determination of the melting point of products utilizing the *Electrothermal*® Melt-Temp Apparatus. The determination of inhibition activity of synthesized products employing *VoltaLab*® apparatus with carbon steel electrode as working electrode, SCE (Saturated Calomel Electrode) as reference electrode, platinum electrode as auxiliary electrode.

B. Synthesis of Ester propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate (1)

A 0.3754 g of Histidine.HCl.H₂O was dissolved into 15mL dry *n*-propanol (dried over Na₂SO₄ anhydrous for 20 minutes) in 100 mL three ways boiling flask. Several drops of pyridine was added into the solution. The

condenser reflux was attached and the reaction mixture was refluxed for 5 minutes. Gradually added 3 drops saturated HCl solution into the reaction mixture and the reflux continued for 3 hours. The reaction progress was monitored by TLC using *n*-hexane : ethyl acetate (v/v) 5 : 1 as eluent. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was collected and evaporated until small amount of solvent remained. The reaction mixture was gradually cooled to obtain white crystal and to be recrystallized in ethyl acetate. The crystal was collected by Büchner funnel. The IR spectrum of compound **1**, wavenumber (cm⁻¹): 3094, 3016, 2884, 1738, 1617, 1588, 1467, 1384, 1353, 1215, 1118, 1084, 927, 809, 623, 533.

C. Synthesis of 2-amino-N-(2-hydroxyethyl)-3-(1H-imidazol-4-yl)propanamide (2)

A mixture of 0.7348 g of Histidine.HCl.H₂O and 4 mL ethanolamine was refluxed in three ways 100 mL boiling flask for 1 hour. The reaction progress was monitored by TLC using *n*-hexane : ethyl acetate (v/v) 5 : 1 as eluent. The reaction mixture was extracted by 2 x 12 mL ethanol-ethyl acetate (v/v) 1 : 1. The organic phase was collected and evaporated until small amount of solution remained. The reaction mixture was cooled gradually to obtain white crystal to be recrystallized in ethyl acetate. The crystal was collected using Büchner funnel. The characterization of product utilizing FTIR spectroscopy. The IR spectrum of compound **2**, wavenumber (cm⁻¹): 3009, 3411, 3000, 2856, 2750, 2500, 1634, 1600, 1566, 1463, 1416, 1341, 1314, 1251, 1147, 1063, 967, 923, 836, 776, 623, 537.

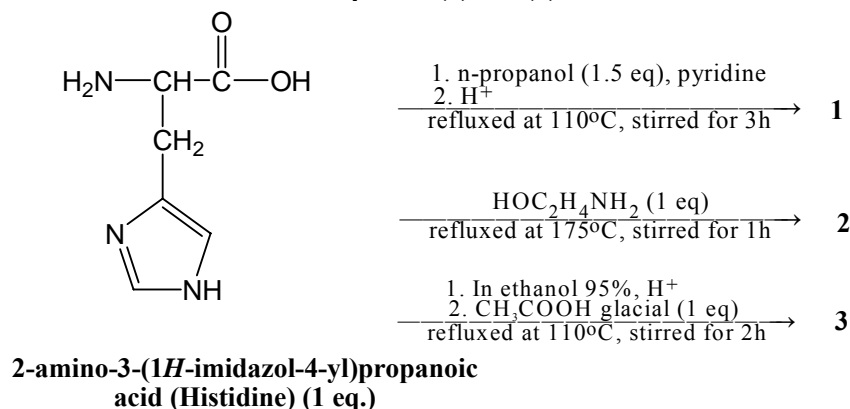
D. Synthesis of ethyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate (3)

Into 10 mL of 95% ethanol in three ways boiling flask was introduced 0.3807 g of Histidine.HCl.H₂O and was stirred to dissolve completely. To the solution was added 7 mL of acetic acid glacial. The reaction mixture was stirred, then 5 drops of saturated HCl solution was added to the reaction mixture. The reaction mixture was refluxed for 2 hours. The reaction progress was monitored by TLC using *n*-hexane : ethyl acetate (v/v) 5 : 1 as eluent. The reaction mixture was extracted by 2 x 10 mL ethanol-ethyl acetate (v/v) 1 : 1. The organic phase was collected and evaporated until small amount of solution remained. The

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Blank Corrosion Rate (mm/Y)} - \text{Sample Corrosion Rate (mm/Y)}}{\text{Blank Corrosion Rate (mm/Y)}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{I_{\text{Blank}} \text{ (mA/cm}^2\text{)} - I_{\text{Sample}} \text{ (mA/cm}^2\text{)}}{I_{\text{Blank}} \text{ (mA/cm}^2\text{)}} \times 100\% \quad (2)$$

equation (1) and (2)



Scheme 1

reaction mixture was cooled gradually to obtain white crystal to be recrystallized in ethyl acetate. The crystal was collected using Büchner funnel. The IR spectrum of compound **3**, wavenumber (cm^{-1}): 3007, 1738, 1618, 1468, 1382, 1352, 1214, 1117, 1083, 926, 807, 622, 533.

E. The Determination of Inhibition Activity Products Using Tafel Method

A 2 mg of crystal products was dissolved in 250 mL 1% (w/v) NaCl solution, to give 8 ppm sample solutions. The 1% NaCl solution was also used as blank solution in each measurement. Into the 600 mL beaker glass equipped with magnetic stirrer was introduced 250 mL of blank solution. The working electrode (carbon steel), the reference electrode (SCE), and auxiliary electrode (platinum electrode) were immersed into the electrolyte solution. Carbon dioxide gas was introduced into the electrolyte solution until saturation reached. The measurement was carried on utilizing *Voltalab*® and Tafel Method software program until the curve of potential measurement towards time was completely formed well. The measurements of each electrolyte solution should be initiated by the measurement of blank solution. The inhibition activity can be calculated using equation (1) or (2):

3. Result and Discussion

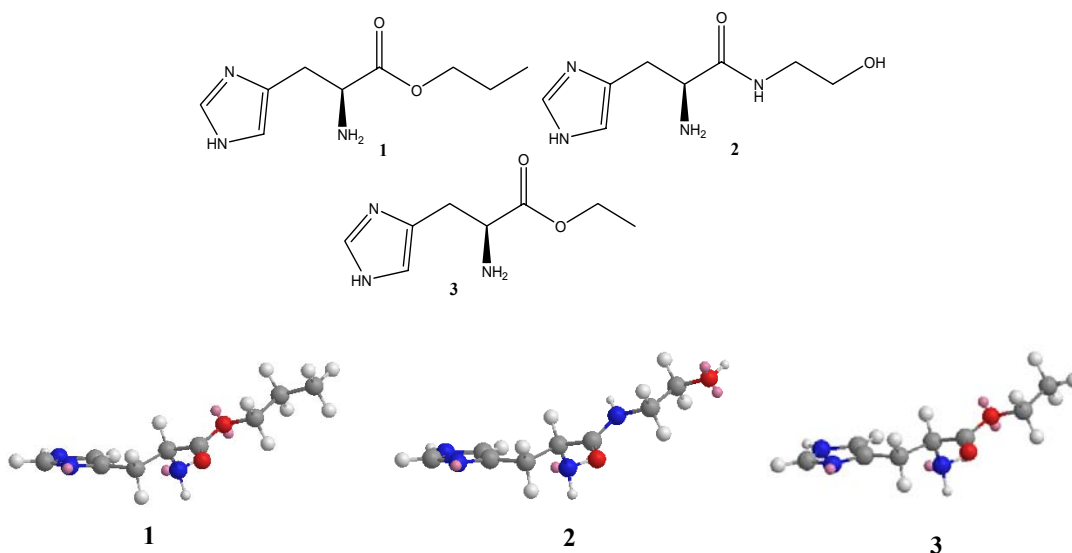
In this study, the synthesis of histidine derivative compounds utilizing common organic functional groups transformation reaction, such as esterification, amidation, and nucleophilic substitution. There are some differences in each process as well as reagents that lead in resulting different products. In Scheme 1 can be seen different processes and reagents lead to three kinds of histidine derivative compounds.

The esterification reaction of histidine was carried out without solvent, because *n*-propanol itself became reactant as well as solvent of histidine. The acid catalysis esterification reaction was carried out using pyridine as a Lewis base to react with excess of acid, therefore it would prevent the hydrolysis of ester that has been produced during the completion of reaction. The product of esterification is compound **1**, propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate. Some physical properties of compound **1** were summarized in Table 1, along with another synthesis products.

The structure characterization of product was analyzed utilizing FTIR spectroscopy. The resulting IR spectrum of each product is different from histidine (2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoic acid). The differences in IR spectrum of histidine and its derivatives

Table 1. Some physical properties of functional group transformation of histidine products

	Histidine.HCl.H ₂ O	Compound 1	Compound 2	Compound 3
Crystal Appearance	White	White	White	White
Yield (%)	-	85.79	45.73	45.09
m.p. (°C)	255 - 256	236 - 238	274 - 276	230 - 232
pH	5	3	8	3

**Figure 3.** The structure of histidine derivative compounds and their 3D molecular model

lead to the assumption that the desired products have been formed. From the IR spectrum of compound **1**, the specific strong peak of carbonyl ester (-CO-OC-) stretching vibration can be found at wavenumber 1738 cm^{-1} , as well as the peak of -C-O-C- stretching vibration at 1084 cm^{-1} . The wavenumber shift from the carbonyl (-C=O) stretching vibration of carboxylic acid peak at $1605 - 1638\text{ cm}^{-1}$ in histidine IR spectrum to the carbonyl ester peak in compound **1** IR spectrum may lead to the conclusion that compound **1** is an ester, that is propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate.

The amidation reaction of histidine was carried out without solvent as well. The ethanolamine was acted both as reactant and solvent for histidine. Reaction was preceded under reflux condition to give compound **2**. From the IR spectrum of compound **2**, the specific strong peak of carbonyl amide (-CO-NC-) stretching vibration can be found at wavenumber 1634 cm^{-1} and the peak of -C-N-C- stretching vibration at 1063 cm^{-1} . These peaks are quite different to the carboxylic acid peaks in histidine IR spectrum; therefore we conclude that compound **2** is an amide, 2-amino-N-(2-

hydroxyethyl)-3-(1H-imidazol-4-yl)propanamide.

The third reaction was subjected to prepare an *N*-acylated histidine derivative compounds, utilizing acetic acid glacial as an acylated reagent to amine group of histidine, as well as the number 1 nitrogen in imidazole ring framework. However, the result led to another course of reaction to give unexpected product, compound **3**, which is can be characterized through its IR spectrum. The amine peaks did not appear at all in IR spectrum of compound **3**, instead the more similar peaks to the IR spectrum of compound **1**. Again, the specific strong peak of carbonyl ester (-CO-OC-) stretching vibration at wavenumber 1738 cm^{-1} , and the peak of -C-O-C- stretching vibration at 1084 cm^{-1} were found in IR spectrum of compound **3**. It leads to the conclusion that the compound **3** is also an ester. This product can be formed in this reaction because in the procedure the use of ethanol as a solvent and the addition of strong acid HCl as catalyst compete to the *N*-acylation reaction at amine position. The addition of acid would protonate the amine group to become an ammonium cation, which is reduced the basicity of amine. Therefore, the amine group became a poor

nucleophile to attack the carbonyl group of acetic acid glacial. As the replacement, esterification reaction was proceeded between carboxylic group of histidine and ethanol to give compound **3**, ethyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate, which is an ester according to its IR spectrum. The similarity of its melting point to the melting point of compound **1** strengthens the conclusion of the ester structure of compound **3**. The structure of compound **1**, **2**, and **3**, as well as their three dimensional structure in their minimized energy state, is presented in Figure 3.

The measurement of the inhibition activity of histidine, compound **1**, **2**, and **3** was utilizing the electrometry method that is Tafel method.

Basic determination of inhibition activity based on Tafel method can be expressed in the following equation:

$$I_{ap} = I_{cor} \left\{ \exp[2.3(E-E_{cor})/\beta_a] - \exp[-2.3(E-E_{cor})/\beta_c] \right\} + C(dE/dt) \quad (3)$$

with: **I_{ap}** = the given current (in mA); **I_{cor}** = corrosion current (in mA); **E** = the given potential (in mV); **E_{cor}** = potential korosi (in mV); **C** = interface capacity; **β_a** dan **β_c** = the anodic and cathodic Tafel coefficient; **dE/dt** = rate of potential change along with determined time or *scan rate*, which is its ideal value is ~ 0. According to equation (3), the relationship between the given current and the output potential produced can be monitored. In this study, the basic calculation of each

Table 2. The measurement of inhibition activity of histidine and its derivatives utilizing Tafel Method

	<i>I</i> _{cor} of Blank solution (mA/cm ²)	<i>I</i> _{cor} of Sample solution (mA/cm ²)	Corrosion Rate of Blank solution (mm/Y)	Corrosion Rate of Sample solution (mm/Y)	% Inhibition
Histidine.HCl.H ₂ O	0.12	0.1184	1.404	1.385	1.35
Compound 1	0.7462	0.3854	8.727	4.508	48.34
Compound 2	0.7462	0.0807	8.727	0.944	89.18
Compound 3	0.1662	0.0985	1.944	1.152	40.74

Table 3. Effect of concentration to inhibition activity of compound **1**, propyl 2-amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoate

Concentration (ppm)	<i>I</i> _{cor} of Blank solution (mA/cm ²)	<i>I</i> _{cor} of Sample solution (mA/cm ²)	Corrosion Rate of Blank solution (mm/Y)	Corrosion Rate of Sample solution (mm/Y)	% Inhibition
6	0.1148	0.0856	1.342	1.002	25.34
12.8	0.1366	0.0715	1.598	0.836	47.68
20	0.2049	0.0965	2.396	1.128	52.92

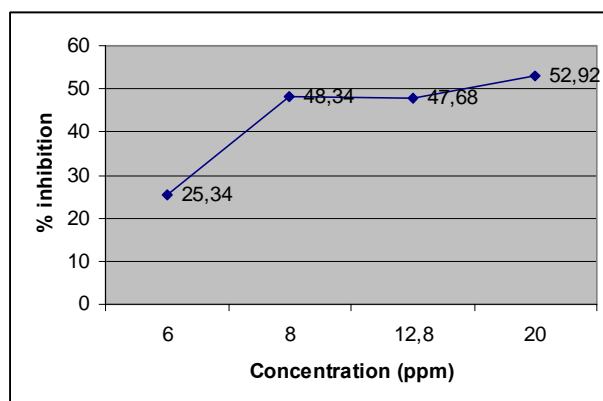


Figure 4. The graphic of correlation between concentration and inhibition activity of compound **1**

measurement of electrolyte solution of sampel was done automatically utilizing the corresponding computer software, which is available in *Voltalab*® processor apparatus. In this measurement, each sample solution and blank solution (1% NaCl solution, which was freshly prepared before use) was prepared according to the procedure described. All of sample solution was prepared at concentration of 8 ppm. The carbon steel to be tested has also been prepared to be set as working electrode. The result of electrochemical measurement is presented in Table 2. The value of % inhibition of each sample was calculated using equation (1).

According to the data, the highest inhibition activity was performed by compound **2**, which has 89.18% inhibition. This result has a good correlation with the pH value of the compound. Compound **2** has pH value of 8, which is one of requirement as a corrosion inhibitor to have a basic property. The basic property of compound **2** came from the additional amide group on the histidine system. The basic condition of corrosion inhibitor is essential to prevent more corrosion of carbon steel. In the case of histidine, compound **1** and compound **3**, the correlation between pH value and % inhibition did not work well. The low pH value of compound **1** and **3** possibly came from the ammonium cation of ester histidine that was formed because of the use of acid catalyst during the reaction. However, the % inhibition of compound **1** and **3** were better than histidine itself, because of the presence of extended alkyl group on compound **1** and **3**. The longer the alkyl chain as ‘tail’ part of corrosion inhibitor, the higher its inhibition activity. In this study, compound **1** has slightly higher inhibition activity than compound **3** because of its propyl

group, rather than ethyl group of compound **3**.

In order to investigate the correlation between inhibitor concentration and its inhibition activity, further measurement of inhibition activity of compound **1** was carried using various concentration. Table 3 was a representation of collected measurement data of compound **1** using the same method.

According to data on Table 3, the increase in concentration of compound **1** gives the improvement of its inhibition activity. Figure 4 shows better visualization of concentration effect to the inhibition activity of compound **1**.

According to some proposed inhibition mechanism of oleic imidazoline type corrosion inhibitor that have been reported previously, the lone pair of nitrogen within imidazoline ring is a crucial part to be adsorbed on metal surface. This lone pair of nitrogen would interact with the empty *d* orbital of transition metal, such as iron and copper those were usually used as material of many industrial types of equipment (Ramachandran, *et.al.*, 1999, 1997, 1996). This interaction between lone pair of nitrogen within imidazoline ring and metal (or metal ion) would form some kind of monolayer of corrosion inhibitor on metal surface (Ramachandran, *et.al.*, 1996; Edwards, *et.al.* 1994). This monolayer would prevent metal surface from any interactions with any compounds that would cause corrosion process. The hydrophobic part of corrosion inhibitor would repel any water molecules and anything that dissolved in it from approaching to metal surface. This mechanism can also be applied to the inhibition action of compound **1**, **2**, and **3** towards carbon steel in this study. The lone pair of nitrogen within imidazole ring framework in compound **1**, **2**, and **3** would

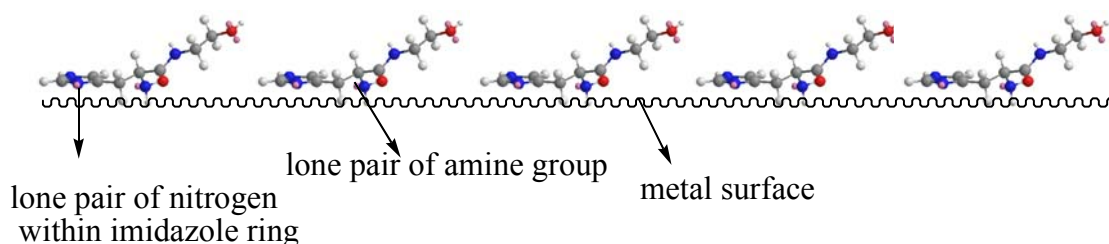


Figure 5. The illustration of monolayer formation of the compound **2** on metal surface.

interact with metal surface. The additional lone pair of amine group within the group would also strengthen the interaction with metal, which is similar to the anchor part action in many oleic imidazoline type corrosion inhibitions. Further study must be taken to confirm the inhibition mechanism of histidine and its derivative compounds. Figure 5 would show the illustration of monolayer formation of compound **2** on metal surface.

4. Conclusion

The functional group transformation reaction of histidine gave compound **1**, **2** and **3**, which are all have potent as corrosion inhibitor, with moderate chemical yields. According to the inhibition activity measurement result utilizing Tafel method, compound **3** gave the highest inhibition activity of 89.18%. The longer the alkyl chain as hydrophobic 'tail' part of corrosion inhibitor, the better its inhibition activity. This rule was obeyed by all of three products of histidine derivative compounds. The increase in concentration of solution compound **1** gave the relative improvement to the inhibition corrosion activity on carbon steel surface in 1% NaCl solution.

5. Acknowledgement

We would like to express our gratitude to everyone who has supported this present works, especially the technicians, laborers and staffs of Departemen Kimia FMIPA ITB. The present works were supported by Hibah RUT (periode of 2005 – 2006) from The Directorate of Higher Education of Indonesia (DIKTI) and Ministry of Research and Technology (Menristek) of Indonesia. All of the measurements equipments and facility were supported by Departemen Kimia FMIPA – ITB, especially Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam for the measurement of IR spectroscopy and Laboratorium Kimia Fisik Material for the measurement of inhibition activity.

6. References

Ali Hassanzadeh, et.al. (2004), Inhibitor Selection Based On Nichols Plot in Corrosion Studies, *Acta. Chim. Slov.*, **51**, 305–316

Cao, P., Gu, R., and Tian, Z. (2003), Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Studies on Interaction of Imidazole with a Silver Electrode in Acetonitrile Solution, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 769-777

Edwards, A., Osborn, C., Webster, D.K., Ostovar, J.P., and Doyle, M. (1994), Mechanistic Studies of

the Corrosion Inhibitor Oleic Imidazoline, *Corrosion Science*, **36**(2), 315-325

Gomma, G.K. (1998), Effect of Azole Compounds on Corrosion of Copper in Acid Medium, *Materials Chemistry and Physics*, **56**, 27-34

Kanicky, J.R., Montilla, J.C. L., Pandey, S., and Shah, D.O. (2001), Surface Chemistry in the Petroleum Industry, In: *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry* edited by Krister Holmberg, Chapter 11, John Wiley & Sons, ISBN 0471490830, 251-267

Lewis, M.L., Ledung, L., and Carron, K.T. (1993), Surface Structure Determination of Thin Films of Benzimidazole on Copper Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Langmuir*, **9**, 186-191

Miksic, B. A. (1998), Volatile Corrosion Inhibitors Find a New Home, In: *Materials Engineering Forum*

Popova, A., Christov, M., Raicheva, S., and Sokolova, E. (2004), Adsorption and Inhibitive Properties of Benzimidazole Derivatives in Acid Mild Steel Corrosion, *Corrosion Science*, **46**, 1333-1350

Raicheva, S.N., Aleksiev, B.V., Sokolova, E.I. (1992), The Effect of The Chemical Structure of Some Nitrogen- and Sulphur-Containing Organic Compounds on Their Corrosion Inhibiting Action, *Corrosion Science*, **34**(2), 343-350

Ramachandran, S., Jovancicevic, V.. (1999), Molecular Modelling of the Inhibition of Mild Steel Carbon Dioxide Corrosion by Imidazolines, *Corrosion*, **55**(33), 259-267

Ramachandran, S., Tsai, B.L., Blanco, M., Chen, H., Tang, Y., and Goddard III, W.A. (1997), Atomistic Simulations of Oleic Imidazolines Bound to Ferric Clusters, *J. Phys. Chem. A*, **101**, 83-89

Ramachandran, S., Tsai, B.L., Blanco, M., Chen, H., Tang, Y., and Goddard III, W.A. (1996), Self-Assembled Monolayer Mechanism for Corrosion Inhibitor of Iron by Imidazolines, *Langmuir*, **12**, 6419-6428

Roberge, P. R. (1999), *Handbook of Corrosion Engineering*, McGraw-Hill, ISBN 007-076516-2

Ruschau, G.R., and Al-Anezi, M.A. (1999), Oil and Gas Exploration and Production, *Oil and Gas Journal*, **1**(97)

Zhao, L., Teng, H.K., Yang, Y. S., and Tan, X. (2004), Corrosion inhibition approach of oil production systems in offshore oilfields, *Materials and Corrosion*, **55**(9), 684-68

Optimasi pH dan Suhu pada Isolasi Minyak Atsiri dari Daun Nilam *Pogostemon cablin* Benth dengan Fermentasi oleh *Pseudomonas mendocina*

Deasyana Mihardja¹⁾, F. Madayanti²⁾

1) Program Studi S1 Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
email : d_mihardja@yahoo.com

2) Staf Pengajar Biokimia Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
email : fida@chem.itb.ac.id

Abstrak

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi pH dan suhu pada isolasi minyak atsiri dari daun nilam *Pogostemon cablin* Benth. Metoda yang digunakan adalah metoda fermentasi dengan bantuan mikroorganisme isolat dari daun nilam, yaitu bakteri *Pseudomonas mendocina*. Aktivasi inokulum menghasilkan umur optimum inokulum 12 jam. Setelah proses fermentasi, dilakukan isolasi minyak atsiri untuk mengetahui rendemen minyak yang dihasilkan. Isolasi minyak atsiri dilakukan dengan metoda ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksana teknis dengan perbandingan 1 : 3 sebanyak tiga kali. Optimasi pH dilakukan dengan fermentasi daun nilam pada suhu kamar dengan variasi pH 5,5; 7,8; 8,0; 8,1; 8,2; dan 8,3. pH optimum ditunjukkan dengan perolehan % yield minyak nilam tertinggi yaitu pada pH 8,0. Optimasi suhu dilakukan dengan fermentasi daun nilam pada pH optimum dengan variasi suhu kamar, 30 °C, 40 °C, dan 60 °C. Suhu optimum ditunjukkan dengan perolehan % yield minyak nilam tertinggi yaitu pada suhu 40 °C. Selanjutnya, dilakukan fermentasi daun nilam pada pH dan suhu optimum untuk mendapatkan minyak nilam dengan % yield optimum. Minyak nilam yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan kromatografi gas cair.

Kata kunci : fermentasi, nilam, pH optimum, suhu optimum

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil minyak atsiri yang cukup penting di dunia. Walaupun sumbangannya bagi devisa negara relatif kecil bila dibandingkan dengan total nilai ekspor, komoditi ini cukup besar peranannya dalam meningkatkan pendapatan masyarakat. Salah satu jenis minyak atsiri yang menjadi komoditi ekspor Indonesia adalah minyak nilam.

Minyak nilam berasal dari tanaman nilam atau *Pogostemon cablin* Benth. Tanaman ini tumbuh di daerah tropis dan banyak terdapat di daerah Jawa, Sumatera, dan Malaysia Barat. Minyak nilam biasanya digunakan sebagai bahan dasar pada industri minyak wangi, pewangi pakaian, pengharum makanan, pengusir serangga, dan industri rokok. Selain itu, minyak ini juga dapat

berperan sebagai fiksatif pada bahan pewangi lain sehingga membantu mempertahankan wangi dari bahan tersebut.

Selama ini minyak atsiri diproduksi dengan cara destilasi, ekstraksi, dan pengempaan. Dari ketiga cara ini, cara destilasi dianggap sebagai metoda yang menguntungkan dan efisien. Namun, cara ini tidak dapat memberikan hasil yang maksimal sehingga tidak dapat memenuhi kebutuhan sesuai permintaan dalam waktu yang singkat.

Proses produksi yang telah digunakan memiliki beberapa kelemahan, yaitu minyak nilam yang dihasilkan memiliki kualitas yang kurang baik. Hal ini disebabkan oleh warna yang gelap. Keberadaan karat besi atau oksida logam lain dan minyak yang teroksidasi merupakan penyebab warna gelap pada minyak nilam yang

dihasilkan. Untuk memperbaiki kualitas minyak, diperlukan proses yang bertujuan untuk menghilangkan warna gelap pada minyak. Ini berarti bahwa proses produksi minyak nilam bertambah. Kelemahan lain adalah rendahnya rendemen yang dihasilkan. Maka dari itu, perlu dicari cara isolasi minyak yang lebih efisien. Baru-baru ini telah ditemukan metoda alternatif untuk isolasi minyak atsiri yaitu metoda fermentasi (Yuliana, 2003).

Proses fermentasi memiliki beberapa keunggulan daripada proses destilasi. Pada proses destilasi, dibutuhkan bahan baku yang cukup banyak dalam satu kali produksi minyak. Pada proses fermentasi, jumlah bahan baku yang digunakan tidak dibatasi sehingga proses produksi dapat berjalan terus tanpa harus menunggu jumlah bahan bakunya terpenuhi. Selain itu, proses produksi dengan cara fermentasi tidak memerlukan proses pengeringan sehingga mempersingkat waktu yang dibutuhkan. Minyak nilam yang dihasilkan dengan proses fermentasi juga memiliki rendemen yang lebih memuaskan daripada proses destilasi. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimum proses fermentasi untuk mengisolasi minyak.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi pH dan suhu pada isolasi minyak atsiri dari daun nilam *Pogostemon cablin* Benth. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi isolat mikroorganisme dari daun nilam, penentuan pH optimum, penentuan suhu optimum, penentuan % yield minyak nilam pada pH dan suhu optimum, dan penentuan kualitas minyak nilam dengan analisa kromatografi gas cair.

2. Percobaan

2.1. Tempat dan bahan penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia ITB. Bahan baku penelitian adalah daun nilam Manoco yang diperoleh dari daerah Lembang. Mikroorganisme yang digunakan adalah isolat dari daun nilam. Bahan kimia yang digunakan berderajat kemurnian pro analisis (p.a.) kecuali bila disebutkan lain.

2.2. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas yang umum digunakan dalam pekerjaan mikrobiologi. Pekerjaan aseptik dilakukan dalam lemari steril Oliphant, Laminar Flow,

VFF 4/L.U.S/No. 344. Selama inkubasi proses fermentasi daun nilam digunakan "Shaking Incubator ROSI 1000 Reciprocating/Orbital Thermolyne" untuk pengocokan medium pertumbuhan. Untuk analisis kualitas minyak, digunakan alat Kromatografi Hewlett Packard 5890 SERIES II yang dilengkapi dengan HP 3396 SERIES II Integrator dengan kolom methylsilicone gum (SE 30) yang panjangnya 30 meter dan gas pembawa nitrogen.

2.3. Cara kerja

Peralatan dan bahan yang tahan panas disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Sterilisasi untuk peralatan yang tidak tahan panas dilakukan menggunakan alkohol 70% dan sinar lampu UV.

Isolasi dan identifikasi mikroorganisme

Koloni mikroorganisme yang berasal dari daun nilam yang permukaannya sudah disapu dengan etanol 70%, tumbuh pada permukaan medium agar nilam. Koloni ini diisolasi dan diidentifikasi di Departemen Biologi ITB dan dikonfirmasi dengan panduan Bergey's Manual.

Aktivasi inokulum

Koloni tunggal mikroorganisme diinokulasikan secara aseptik ke 10 mL medium 100% nilam. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan agitasi 150 rpm selama 12 jam sehingga diperoleh inokulum I. Inokulum ini digunakan sebagai *starter* untuk aktivasi inokulum dengan jumlah yang lebih besar, yaitu 50 mL dan 150 mL sehingga diperoleh inokulum III. Aktivasi dilakukan dengan kondisi yang sama, yaitu diinokulasi secara aseptik sebanyak 5% v/v dan diinkubasi pada suhu kamar dengan agitasi 150 rpm selama 12 jam. Inokulum III diinokulasikan ke 150 mL medium 100% nilam dan diinkubasi pada suhu kamar dengan agitasi 150 rpm sehingga didapatkan inokulum IV. Kemudian, dilakukan sampling dan isolasi minyak atsiri dengan interval waktu 3 jam sebanyak 3 titik dan 6 jam sebanyak 4 titik serta pengukuran pH sehingga diperoleh kurva perumbuhan.

Pada saat sampling, medium 100% nilam yang berisi inokulum sebagian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan sebagian lagi difiltrasi dengan menggunakan kertas saring Whatman 41. Endapan dan residu dibuang sedangkan supernatant dan filtrat

diukur absorbannya pada panjang gelombang 600 nm. Untuk isolasi minyak atsiri, dilakukan dengan metoda ekstraksi cair-cair sebanyak tiga kali dengan pelarut n-heksana teknis dengan perbandingan pelarut : supernatan = 1 : 3. Fasa air dibuang sedangkan fasa organik dikeringkan dengan menambahkan Na_2SO_4 anhidrat dan dipisahkan dengan menggunakan rotavapor. Minyak yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

Fermentasi dengan variasi pH

Sampel daun nilam yang telah disterilisasi ditambahkan buffer natrium fosfat 0,1 M dengan perbandingan 1 : 10 dan diblender sehingga didapatkan medium 100% nilam. Variasi pH yang digunakan adalah pH 5,5; 7,8; 8,0; 8,1; 8,2; dan 8,3. Medium 100% nilam diinokulasi dengan inokulum IV dan diinkubasi pada suhu kamar dengan agitasi 150 rpm selama 12 jam. Selanjutnya, dilakukan isolasi minyak atsiri dan penentuan pH optimum.

Fermentasi dengan variasi suhu

Sampel daun nilam yang telah disterilisasi ditambahkan buffer natrium fosfat 0,1 M pH optimum dan diblender. Medium 100% nilam diinokulasi dengan inokulum IV dan diinkubasi pada berbagai variasi suhu selama 12 jam. Variasi suhu yang digunakan adalah suhu kamar, 30 °C, 40 °C, dan 60 °C. Selanjutnya, dilakukan isolasi minyak atsiri dan penentuan suhu optimum.

Fermentasi dengan pH dan suhu optimum

Sampel daun nilam yang telah disterilisasi ditambahkan buffer natrium fosfat 0,1 M pH optimum dan diblender. Medium 100% nilam diinokulasi dengan inokulum IV dan diinkubasi pada suhu optimum dengan kondisi yang sama. Selanjutnya, dilakukan isolasi minyak atsiri dan penentuan % yield minyak optimum.

Analisa kromatografi gas cair

Analisa kromatografi gas cair dilakukan dengan

menggunakan alat kromatografi Hewlett Packard 5890 SERIES II yang dilengkapi dengan HP 3396 SERIES II Integrator dengan kolom methylsilicone gum (SE 30) yang panjangnya 30 meter dan gas pembawa nitrogen. Minyak nilam dilarutkan dalam aseton p.a, kemudian disuntikkan pada tempat pemasukan sampel.

Kondisi paling baik yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Kecepatan alir N_2	30 mL/menit
Kecepatan alir H_2	35 mL/menit
Kecepatan alir udara	400 mL/menit
Suhu injeksi	200 °C
Suhu detektor	225 °C
Kenaikan suhu	10 °/menit
Kepekaan	10 mV
Kecepatan kertas	0,5 cm/menit
Suhu kolom	175 °C

Suhu awal kolom 70 °C dibiarkan selama 2 menit, kemudian naik hingga suhu 175 °C dengan kenaikan suhu 10 °/menit dan dipertahankan pada suhu tersebut selama 8 menit. Analisa dilakukan terhadap minyak hasil fermentasi dan dibandingkan dengan standar.

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Isolasi dan identifikasi mikroorganisme

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum isolasi minyak atsiri dari daun nilam dengan menggunakan metoda fermentasi. Metoda ini diharapkan dapat menggantikan metoda isolasi yang telah ada sebelumnya. Metoda fermentasi yang digunakan adalah fermentasi secara *batch* dengan menggunakan mikroorganisme isolat dari daun nilam.

Sampel daun nilam disapu permukaannya dengan menggunakan etanol 70%. Hal ini dilakukan untuk seleksi dan menghilangkan mikroorganisme kontaminan yang ada pada permukaan daun. Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan di Departemen Biologi ITB dan merujuk pada panduan Bergey's Manual,



Gambar 1 Hasil identifikasi mikroorganisme pada mikroskop

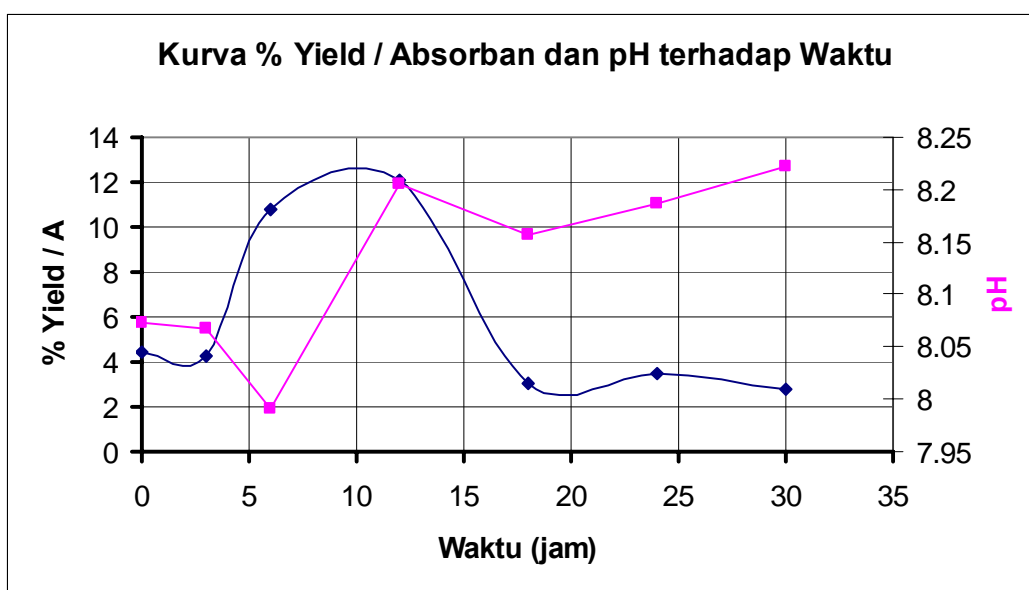
disimpulkan bahwa isolat mikroorganisme dari daun nilam adalah bakteri *Pseudomonas mendocina*. Gambar 1 menunjukkan hasil identifikasi mikroorganisme pada mikroskop.

3.2. Aktivasi inokulum

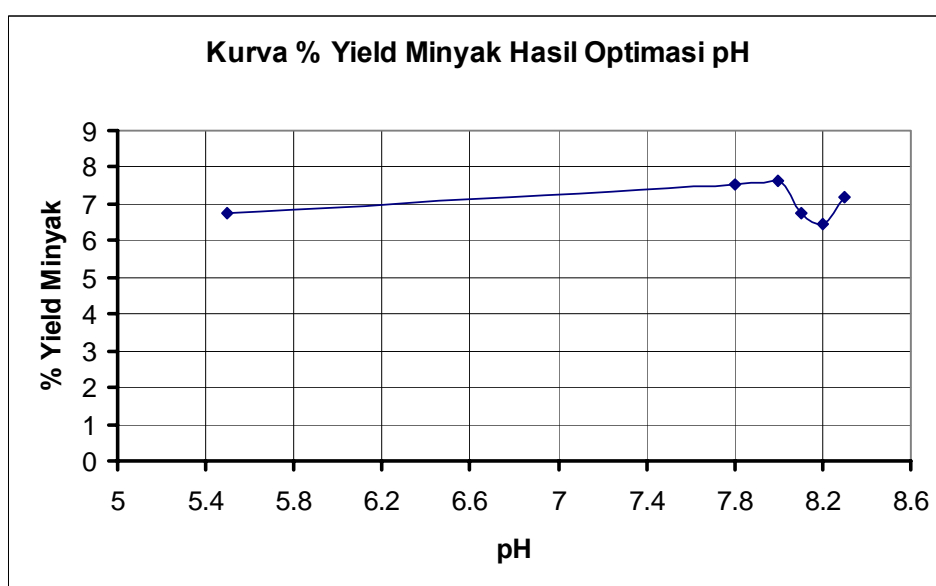
Biakan murni bakteri *Pseudomonas mendocina* yang ditumbuhkan pada medium agar nilam diinokulasikan ke medium 100% nilam. Inokulum yang didapatkan dari inokulasi ini digunakan sebagai *starter* untuk aktivasi inokulum dengan jumlah medium yang lebih besar, yaitu mulai dari 10 mL, 50 mL, dan 150

mL. Dari aktivasi inokulum ini didapatkan kurva pertumbuhan yang merupakan aluran % yield / absorbansi dan pH terhadap waktu.

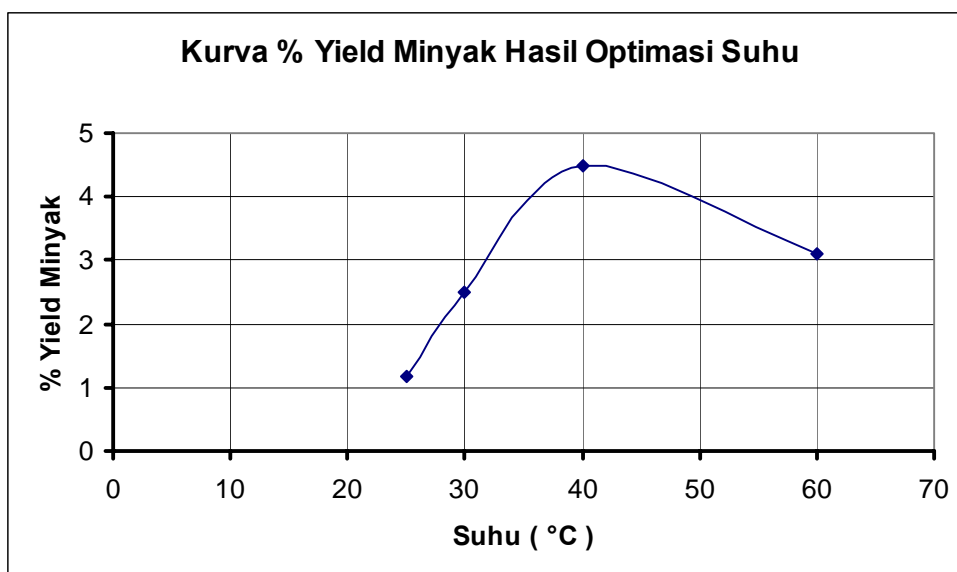
Pada Gambar 2, terlihat bahwa pertumbuhan optimum diperoleh pada waktu 12 jam. Hal ini dapat dilihat dari harga % yield / absorbansi tertinggi, yaitu 12,05%. Untuk fermentasi selanjutnya dengan menggunakan inokulum ini, dipilih waktu 12 jam sebagai waktu fermentasi optimum. Profil range pH yang didapatkan dari pengukuran pH pada aktivasi inokulum digunakan sebagai dasar pemilihan variasi pH



Gambar 2 Kurva pertumbuhan *Pseudomonas mendocina*, perolehan minyak nilam hasil isolasi, dan profil pH medium



Gambar 3 Kurva % yield minyak hasil optimasi pH



Gambar 4 Kurva % yield minyak hasil optimasi suhu

pada optimasi pH.

3.3. Fermentasi dengan variasi pH

Pada fermentasi ini, digunakan buffer natrium fosfat 0,1 M sebagai pengganti aqua dm untuk mempertahankan pH medium. Pemilihan variasi pH didasarkan pada profil pH medium pada aktivasi inokulum, yaitu antara 7,9 – 8,3 sedangkan pH 5,5 dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya dan untuk melihat pengaruh pH pada rendemen minyak. Dari optimasi pH, dibuat kurva aluran % yield minyak terhadap waktu.

Pada Gambar 3, dapat dilihat bahwa % yield minyak tertinggi diperoleh pada pH 8,0, yaitu sebesar 7,63%. Hal ini menunjukkan bahwa pH optimum untuk fermentasi daun nilam dengan inokulum *Pseudomonas mendocina* adalah pH 8,0. Dari data % yield minyak pada pH 5,5, dapat dilihat bahwa pH tidak berpengaruh banyak pada rendemen minyak yang diperoleh. Untuk proses fermentasi selanjutnya, dipilih pH 8,0 sebagai pH optimum fermentasi.

3.4. Fermentasi dengan variasi suhu

Fermentasi dilakukan pada berbagai variasi suhu untuk mencari suhu optimum bagi proses fermentasi. Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa % yield minyak tertinggi diperoleh pada suhu 40 °C, yaitu sebesar 4,5%. Untuk proses fermentasi selanjutnya, dipilih suhu 40 °C sebagai suhu optimum fermentasi.

4. Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa proses fermentasi daun nilam dengan menggunakan *Pseudomonas mendocina* paling baik dilakukan pada pH 8,0 dan suhu 40 °C. Fermentasi pada kondisi optimum ini menghasilkan % yield minyak tertinggi. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan penelitian mengenai produksi minyak nilam dalam skala besar dengan menggunakan metoda fermentasi.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Fida Madayanti atas semua bimbingan, kesabaran, dan pengetahuan yang telah diberikan selama melakukan penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu dalam penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

6. Daftar pustaka

- Buchanan, R. E. and Gibbons, E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. The Williams and Wilkins Co. Inc.
- Guenther, E., (1948). *The Essential Oils*, vol. I, Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., Florida.
- Prescott, Samuel C., et al., (1959). *Industrial Microbiology*, 3rd ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, p. 515 – 518.
- Schuler, M. L. and Kargi, F., (1992). *Bioprocess Engineering : Basic Concepts*, Prentice Hall International Inc., New Jersey.

Deasyana Mihardja, Fida Madayanti

.Stanbury, Peter F. and Whitaker, Allan, (1984). *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press England, p. 1 – 8.

Yuliana, Delita. (2003). *Alternatif Lain Isolasi Minyak Atsiri dari Daun Nilam Pogostemon cablin Benth*, Skripsi Sarjana Kimia ITB, Bandung.

Expression of ALP1 in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*

Dessy Natalia^{1,2)}, Gunawan Harinanto^{1,2)}
Wangsa T. Ismaya²⁾, Toto Subroto³⁾, Zeily Nurachman¹⁾,
Soetijoso Soemitro^{2,3)}, Thijs Karper⁴⁾, Slavko Krajc⁴⁾, Bauke Dijkstra⁴⁾, Lubert
Dijkhuizen⁴⁾

1) Department of Chemistry, Institut Teknologi Bandung

2) Biotechnology Research Division, Institut Teknologi Bandung,

3) Department of Chemistry, Padjajaran University,

3) Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, The Netherlands

Abstract

α-Amylases are widely used in industries that include foods, pharmaceuticals, animal feed and detergent. *α*-Amylases are produced by a wide range of organisms, such as bacteria, yeasts, fungi, plants, insects and mammals. *Saccharomycopsis fibuligera* R-64 isolated from Indonesian soil produces *α*-amylase. An ALP1 gene encoding for *α*-amylase had been isolated by PCR method. The ALP1 gene had been subcloned into *Escherichia coli* expression vector pET16b. There was no *α*-amylase activity detected in *E. coli* BL21 Star DE3 harboring pET16b-ALP1. It is possible that the *S. fibuligera* R-64 *α*-amylases polypeptide produced in *E. coli* could not fold properly. The ALP1 gene had also been subcloned into *Saccharomyces cerevisiae* expression vector yEPSecretex. The expression of ALP1 gene was regulated by GAL-PGK hybrid promoter. Yeast INVSc/[yEPSecretex-ALP1] secreted *α*-amylase as an active enzyme.

Keywords: *α*-amylase, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae*, disulphide bonds

1. Introduction

The amylase family is widely used in various industries, such as starch processing, food, brewing and textile, paper and detergent industries. It has also a great potential application in clinical, medicinal and analytical chemistries. Four classes of enzymes work in concert in starch degradation processes, namely endo and exo-amylase, debranching enzymes, and cyclodextrin glycosyltransferase. Although enzymes of this family act on starch, not all of them share common structure, reaction mechanism and evolution. Properties of enzymes hydrolysing starch vary and are more or less related to the growth environment of the producing organism.

α-Amylase hydrolyzes *α*-1,4 glucosidic bonds

such as starch and glycogen. *α*-Amylases are widely used in industries that include foods, pharmaceuticals, animal feed and detergent. *α*-Amylases are produced by a wide range of organisms, such as bacteria, yeasts, fungi, plants, insects and mammals. Previously, we have a collection of 136 isolates possessing amylolytic activity collected from different region in Indonesia. Amongst these isolated, *Saccharomycopsis fibuligera* R64 has the highest activity of amylase and glucoamylase. A gene encoding for amylase (ALP1) of *S. fibuligera* R64 has been isolated. In scripto analysis of ALP1 shows that it is similar with published sequence except for three amino acid substitutions. In this paper, expression of ALP1 in *E. coli* and *S. cerevisiae* was presented.

2. Experimental

Subcloning *ALPI* in *Escherichia coli*

Expression Vectors

The *ALPI* gene was first amplified by using a set of primers of AMF5 (GAGGACTCGAGGTGACTCTATTCAAAA GAGAAA) and AMR5 (GAGGACTCGAGGTGACTCTATTCAAAA GAGAAA). These primers contain restriction enzyme site of *XhoI* which was used for subcloning. A recombinant plasmid pGEMT-*ALPI* was used as a template. The PCR conditions was as follows: denaturation at 95°C for 1 minute; followed with 25 cycles of denaturation at at 95°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 1 minute, elongation at 68°C for 1.5 minutes; and post elongation at 68°C for 5 minutes. The resulted 1.4 kb DNA fragment was digested with *XhoI* and then ligated with pET16b previously digested with *XhoI* and treated with alkaline phosphatase. The resulted pET16b-*ALPI* was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Transformation of Yeast INVSc1

A *S. cerevisiae* expression strain of INVSc1 (Mata *hisD1 leu trp1-289 ura3-52* and Mata *hisD1 leu trp1-289 ura3-52*) from Invitrogen was transformed with a recombinant plasmid of yEP-Secretex *ALPI*. This recombinant plasmid was constructed at ITB (Indonesia). The yeast

transformation was carried out according to the protocol described in the *S. c.* Easy Comp™ Transformation kit (Invitrogen). The transformants appeared after one day of incubation at 30 °C. The cells were then kept at 30 °C for 5 days. The resulted transformant was designated as INVSc1/ yEP-Secretex *ALPI*.

Expression of *ALPI* in yeast INVSc1

A single colony of the yeast DNA was inoculated in 10 ml of SC media containing appropriate supplement. The yeast cells were grown until OD₆₀₀ of app. 0.8 at 30 °C. The yeast cultures were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10 min. The cells were washed with sterile dH₂O. The cells (with a total OD₆₀₀ of 0.1) were transferred into 3XYP medium containing 4.8% galactose for induction or 6% glucose. Cells were grown for 2- 3 days at 30 °C.

α-Amylase Assay

A mixture of 0.5 ml of culture filtrates and 0.5 ml of 50 mM Sodium maleic phosphate pH 6,5, 1% (w/v) soluble potato starch was incubated at 37 °C for 90 min. Reactions were stopped by immersion of the tubes in a boiling bath for 5 min. Samples (25µl) were then added to 0.1 ml of a solution of 0.4% (w/v) KI + 0.125% (w/v) I₂ a microtiter plate. Hydrolyzed starch was estimated by reading absorbance at 595 nm using *Elisa Reader-Spectrophotometer*. One

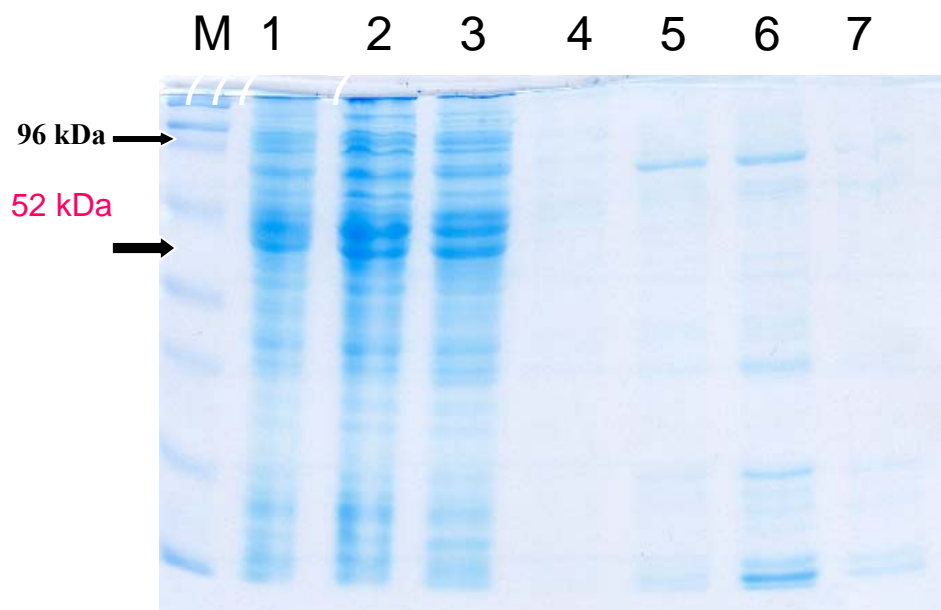


Figure 1. SDS-PAGE analysis of the purification of cell free extract of *E. coli* BL21 Star DE3/[pET16b/K1]. Lanes 1, cell free extract; 2, flow through; 3, wash; 4, fraction 1; 5, Fraction 2; 6, Fraction 3; 7, Fraction 4.

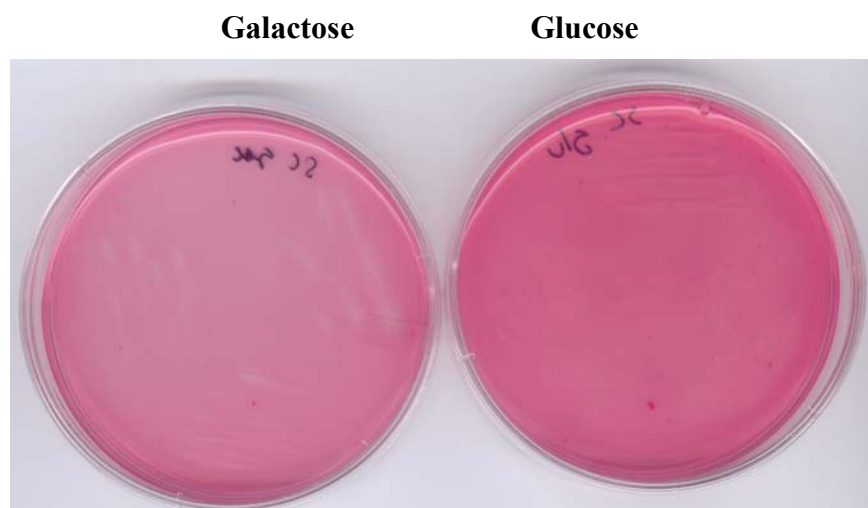


Figure 2. Secretion of α -amylase by yeast INVSc1-yEP Secretex *ALP1*. Incubation was at room temperature for 48 h. A clear halo appeared around yeast cells secreting α -amylase.

unit of amylase activity was defined as the decrease of OD_{595} of 10% under the experimental condition.

3. Results and Discussion

Expression of *ALP1* in *Escherichia coli*

E. coli BL21 Star DE3 was transformed with pET16b-*ALP1*/K1. Expression of *ALP1* was induced by addition of 0.2 mM of IPTG for 2h. Cell free extract was purified by Ni-NTA Agarose. The molecular weight of amylase is expected to be about ~54 kDa. SDS-PAGE analysis showed the presence of protein at molecular weight of much higher than the expected ~54 kDa in fraction 2 and 3 (Figure 1, lanes 5 and 6). The amylase activity was then determined by starch-iodine based assay as described in the Material and Method. It was found that OD_{595} of cell free extract and the purified fractions was similar with that of control (buffer). It could be concluded that there were no α -amylase recombinant (*ALP1*) detected in the *E. coli* BL21 Star DE3/[pET16b-*ALP1*/K1]. The polypeptide might not be able to fold properly or is possibly very unstable, and hence could be degraded rapidly. Another possible explanation is that efficiency of translation the *ALP1* mRNA is low due to different codon preference.

Expression *ALP1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1

A yeast INVSc1 was transformed with yEP-Secretex-*ALP1* as described in Materials and Methods. The expression of *ALP1* gene will be

regulated by a hybrid promoter of *PGK-GAL*. The vector contains an oligonucleotide encoding a signal peptide of invertase.

Secretion of *ALP1* in INVSc1-yEP-Secretex-*ALP1* was first analyzed by using a selective media agar containing appropriate supplements and red amylopectin. After 48h of incubation at room temperature a clear halo appeared around yeast cells secreting *ALP1*. The halo was larger in the yeast cells grown in medium containing galactose compared to that of glucose. It should be noted that *S. cerevisiae* produce no α -amylase.

The *ALP1* activity of INVSc1-yEP Secretex *ALP1* was then determined by the starch-iodine based assay as described in the Material and Method. The activity of culture filtrate of INVSc1-yEP Secretex grown in 4.8% galactose media was 46.8 U/3 OD_{600} while the activity in glucose media was 18.6 U/3 OD_{600} . This result showed that the *ALP1* had been successfully expressed in *S. cerevisiae* as an active protein.

4. Acknowledgements

This work was funded by Hibah Bersaing IX and The Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences Scientific Programme Indonesia-Netherlands

5. References

Abarca, D., Fernandez-Lobato, M., Claros, M. G., Jimenex, A. 1989. Isolation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene encoding an amylase from *Schwanniomyces castellii*. FEBS Lett. **255**: 455-459.

**Dessy Natalia, Gunawan Harinanto, Wangsa T. Ismaya, Toto Subroto, Zeily Nurachman,
Soetijoso Soemitro, Thijs Karper, Slavko Krajl, Bauke Dijkstra, Lubert Dijkhuizen**

Itoh, T., Hamashita, I., Fukui, S. 1987. Nucleotide sequence of the amylase gene *ALP1* in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *FEBS Lett.* **219**: 435-445.

Janecek, S. 1997. α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **67**: 67-97.

Yanez, E., Carmona, T. A., Tiemblo, M., Jimenez, A., and Fernandez-Lobato, M. 1998. Expression of *Schawanniomyces occidentalis* *SWA2* amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem. J.* **329**: 65-71.

Sintesis Kompleks Besi(II)-3,6-di-2-piridil-1,2,4,5-tetrazin (DPTz)

Djulia Onggo¹, Dini Zakiah Fathiana¹, Ibrahim Baba².

- 1) Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10. Bandung 40132, Indonesia. E-mail: djulia@chem.itb.ac.id
 2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan teknologi Makanan, Fakulti Sains dan teknologi, University Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan

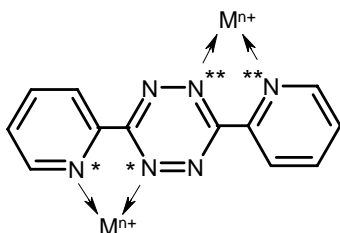
Abstrak

Senyawa kompleks besi(II) dengan ligan 3,6-di-2-piridil-1,2,4,5-tetrazin(DPTz) telah disintesis dari garam besi(II) tetrafluoroborat dan perklorat. Kompleks yang berhasil diisolasi merupakan kompleks berinti tunggal dengan rumus kimia $[Fe(DPTz)_2H_2OEtOH] X_2$ dengan $X = BF_4^-$ dan ClO_4^- . Kedua kompleks berupa padatan serbuk berwarna biru tua. Keduanya memiliki sifat magnet yang unik, di mana pada temperatur ruang perbandingan fraksi spin tinggi dan spin rendah diamati sekitar 3:7. Dengan pemanasan pada temperatur sampai 60°C kedua kompleks menunjukkan sifat paramagnetik dengan fraksi spin tinggi mencapai > 90%.

Kata kunci: besi(II), DPTz, magnet.

1. Pendahuluan

Ligan 3,6-di-2-piridil-1,2,4,5-tetrazin(DPTz) sangat menarik untuk diteliti karena selain memiliki kerangka struktur mirip 2,2-bipiridin, ligan ini memiliki enam atom donor nitrogen yang memungkinkan terbentuknya kompleks berinti jamak. Struktur ligan DPTz dapat



Gambar-1 struktur ligan DPTz

dilihat pada Gambar-1.

Walaupun ligan ini memiliki banyak atom donor, tidak semua atom donor dapat mendonasikan pasangannya elektronnya. Senyawa kompleks berinti tunggal terjadi bila hanya atom-atom N* yang berfungsi mendonasikan elektron, sedangkan kompleks berinti dua atau lebih terbentuk jika atom-atom donor N* dan N** berfungsi sebagai atom donor. Beberapa contoh kompleks berinti lebih dari satu telah diteliti, diantaranya kompleks seng(II) perklorat

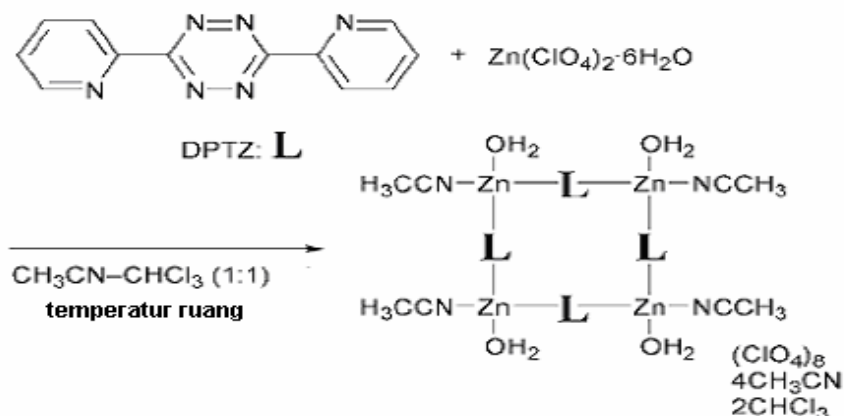
berinti empat yang berupa kristal *chiral* di mana DPTz menjadi ligan penghubung bagi ke empat ion logam seng (Bu. Et al., 2000). Skema pembentukan kompleks ini ditunjukkan pada Gambar-2.

Selanjutnya kompleks nikel dengan ligan DPTz telah dilaporkan Campos. Et al, 2001 sebagai senyawa kompleks berinti lima dengan anion SbF_6^- . Penggunaan anion ini didasarkan pada ukuran volume SbF_6^- yang lebih besar dari perklorat maupun tetrafluoroborat. Struktur dan reaksi pembentukan kompleks ini ditunjukkan pada Gambar-3.

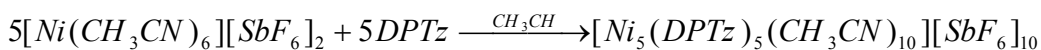
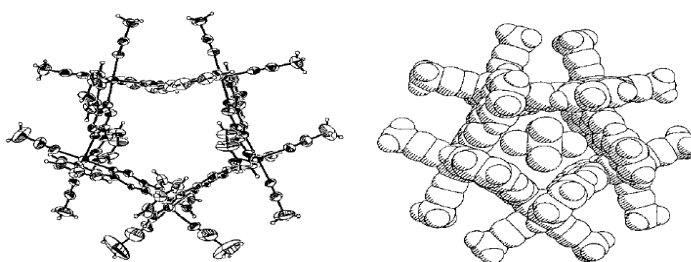
Kompleks berinti banyak sekarang ini diminati untuk diteliti karena memiliki banyak manfaat baik sebagai material elektronik maupun sebagai material magnet. Sejauh ini kompleks besi(II) dengan ligan tersebut belum banyak dilaporkan, untuk itu dilakukan penelitian sintesis senyawa kompleks besi(II) dengan ligan DPTz agar dapat diketahui perilaku kompleks yang terbentuk.

2. Percobaan

Sebagai sumber besi(II) digunakan garam tetrafluoroborat dan garam perklorat, masing-masing memiliki rumus molekul $Fe(BF_4)_2$



Gambar-2 Pembentukan kompleks seng-DPTz



Gambar-3 Struktur dan reaksi pembentukan kompleks nikel(II)-DPTz

6H₂O dan Fe(ClO₄)₂·6H₂O. Ligan DPTz diperoleh langsung dari Aldrich dengan kualitas pa. Sebanyak 0,5 gram DPTz dilarutkan dalam 60 mL ethanol dengan bantuan pengadukan dan pemanasan. Ke dalam larutan panas ini dimasukkan 1,35 gram Fe(BF₄)₂·6H₂O yang telah dilarutkan dalam 10 mL aquadest. Setelah reaksi sempurna, campuran reaksi ini dibiarkan pada suhu ruang. Produk diperoleh dalam bentuk padatan setelah satu malam. Padatan ini disaring, dicuci dengan etanol dan dikeringkan dalam desikator. Untuk kompleks perklorat, prosedur yang sama dilakukan dengan menggunakan 1,48 gram Fe(ClO₄)₂·6H₂O yang dilarutkan dalam 5 mL ethanol. Kedua senyawa kompleks yang dihasilkan direkrystalisasi dengan cara dilarutkan dalam air sambil diaduk dan dipanaskan dalam alat *reflux* selama 1 jam. Setelah itu campuran disaring dalam keadaan panas untuk memisahkan pengotor dari larutan kompleks. Pelarut dalam larutan kompleks ini diuapkan sampai kira-kira 60% dari volum semula dengan menggunakan alat *rotary vapour*. Padatan kristalin berwarna biru tua

dihasilkan dari larutan kompleks ini dengan rendemen sekitar 50-60%.

3. Hasil dan pembahasan

Sintesis dilakukan dalam atmosfer argon untuk mencegah besi(II) teroksidasi menjadi besi(III) dan pelarut yang digunakan sudah dideoksigenasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Perbandingan mol ligan:ion logam digunakan 1:2 karena senyawa target semula adalah kompleks berinti dua.

Ligan DPTz memiliki keterbatasan pada kelarutannya dalam pelarut-pelarut yang digunakan. Oleh karena itu ligan ini dilarutkan dalam volum yang relatif besar (60 mL) dan dibantu dengan proses *reflux*. Ligan DPTz lebih mudah larut dalam aseton dibanding dalam etanol, tetapi kompleks besi(II) dengan ligan ini memiliki kelarutan yang sangat besar dalam aseton, sehingga aseton bukan pelarut yang ideal untuk sintesis kompleks ini.

Sintesis kompleks ini dilakukan dalam keadaan panas untuk mencegah ligan DPTz terkristalkan kembali dan kompleks yang terbentuk dapat terkontaminasi dengan padatan kristalin ligan. Kedua kompleks yang terbentuk berupa

Tabel-1 Hasil analisis elemental senyawa kompleks

Rumus Molekul	Fe	C	H	N
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (BF ₄) ₂	7,57(7,31)	40,87(40,75)	1,97(3,13)	19,44(21,94)
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (ClO ₄) ₂	7,32(7,08)	39,67(39,44)	3,26(3,03)	18,73(21,23)

Tabel-2 Hantaran molar senyawa

Senyawa	Hantaran Molar S Cm ² mol ⁻¹	Jumlah ion	Perbandingan muatan ion
KCl(aq)	113	2	1:1
Fe(ClO ₄) ₂ (aq)	271	3	2:1
AlCl ₃ (aq)	413	4	3:1
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (BF ₄) ₂	270	3	2:1
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (ClO ₄) ₂	268	3	2:1

Tabel-3 Faksi spin rendah dan spin tinggi senyawa kompleks.

Senyawa Kompleks	Temperatur (°C)	Momen magnet μ (BM)	Fraksi spin rendah	Fraksi spin tinggi
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (BF ₄) ₂	25	2,50	0.66	0.34
	40	3,92	0.34	0.66
	60	5,25	0.04	0.96
[Fe(DPTz) ₂ H ₂ OEtOH] (ClO ₄) ₂	25	2,38	0.69	0.31
	40	3,57	0.42	0.58
	60	4,82	0.13	0.87

padatan biru tua yang larut dalam air, maka rekristalisasi dilakukan dalam air disertai dengan proses *reflux* untuk meningkatkan kelarutannya, tetapi setelah semua spesi kimia berada dalam bentuk larutan, ternyata padatan kompleks sukar diisolasi secara sempurna, untuk itu digunakan alat *rotary vapour* untuk menurunkan volume pelarut sehingga sejumlah produk dapat diisolasi dari larutannya.

Rendemen yang diperoleh untuk kompleks tetrafluoroborat 0,37gram (51%) ternyata lebih rendah dari kompleks perklorat 0,47 gram (62%), ini difahami karena umumnya kompleks tetrafluoroborat lebih bersifat higroskopik dari kompleks perklorat.

Kompleks yang terbentuk ternyata bukan kompleks berinti ganda melainkan kompleks berinti tunggal, dengan dua molekul ligan dan dua molekul pelarut terkoordinasi. [Fe(DPTz)₂H₂OEtOH](BF₄)₂ dan [Fe(DPTz)₂H₂OEtOH](ClO₄)₂. Rumus molekul ini diperoleh dengan pendekatan hasil analisis ion logam besi(II), kadar C, H dan N walaupun hasil analisis unsur nitrogen yang diperoleh relatif lebih rendah dari perhitungan teoritis.

Data analisis kedua kompleks ditunjukkan pada Tabel-1.

Pengukuran hantaran menunjukkan nilai hantaran molar kedua kompleks mirip dengan hantaran molar larutan besi(II) perklorat sehingga ion tetrafluoroborat dan perklorat tetap berfungsi sebagai anion. Data hantaran molar kompleks dan senyawa ion standar terangkum pada Tabel-2.:

Sifat magnet dari kedua senyawa kompleks ini sangat unik. Pada temperatur ruang, kedua senyawa kompleks menunjukkan momen magnet yang sesuai dengan perbandingan fraksi spin tinggi dan spin rendah sekitar 3:7. Dengan perlakuan pemanasan sampai 60°C kemudian dibiarkan pada temperatur ruang selama 30 menit ternyata terjadi peningkatan fraksi spin tinggi untuk besi(II). Perlakuan pemanasan pada kompleks ini mirip seperti yang telah dilakukan pada kompleks besi(II)-bithiazole(Onggo dan Goodwin, 2002) namun pada kompleks DPTz ini pemanasan dilakukan pada dua tahap temperatur yaitu 40 dan 60°C, dan hasil pemanasan mengubah hamper semua fraksi spin rendah menjadi spin tinggi tetapi tidak menunjukkan keadaan transisi-spin

seperti yang dialami pada kompleks besi(II)-bithiazole. Perubahan keadaan menjadi spin tinggi teramati sangat mencolok pada kompleks tetrafluoroborat. Data momen magnet dan perhitungan fraksi spin rendah dan spin tinggi kedua senyawa kompleks dirangkum pada Tabel-3.

Fraksi spin tinggi (X_{st}) dihitung dari hubungan momen magnet teramati dengan limit momen magnet spin tinggi (μ_{st}) besi(II) dan limit momen magnet spin rendah (μ_{sr}) besi(II) sesuai dengan Persamaan-1 berikut:

$$\text{Momen teramati } \mu = X_{st} \mu_{st} + X_{sr} \mu_{sr} \quad (\text{Persamaan-1})$$

Dengan asumsi (μ_{st}) = 5,4 BM dan (μ_{sr}) = 1,0 BM dan fraksi spin rendah (X_{sr}) = (1 - X_{st}) maka penentuan fraksi spin tinggi dapat disederhanakan sesuai dengan Persamaan-2 berikut:

$$\text{Fraksi spin tinggi } (X_{st}) = (\mu - 1)/4,4 \quad (\text{Persamaan-2})$$

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan senyawa kompleks besi(II) dengan ligan DPTz merupakan senyawa kompleks berinti tunggal dengan rumus kimia $[\text{Fe}(\text{DPTz})_2\text{H}_2\text{OEtOH}]X_2$ dengan $X = \text{BF}_4^-$ dan

ClO_4^- . Kedua kompleks berupa serbuk berwarna biru tua dengan sifat magnet yang unik. Pada temperatur ruang teramati adanya fraksi spin rendah dan spin tinggi dengan perbandingan sekitar 7:3. Pemanasan sampai 60°C pada kedua senyawa kompleks menghasilkan perubahan fraksi spin rendah menjadi spin tinggi.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung dan Universiti Kebangsaan Malaysia atas dukungan pada penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

- Bu, X. H., Morishita, H., Tanaka, K., Biradha, K., Furusho, S., Shionoya, M., (2000). A spontaneously resolved chiral molecular box: a cyclic tetranuclear Zn(II) complex with DPTz (DPTZ = 3,6-di-2-pyridil-1,2,4,5-tetrazine). *Chem. Commun*, 971-972
- Campos, F. C.S., Clerac, R., Koomen, J. M., Russell, D. H., Dunbar, K. R., (2001). Fine-Tuning the Ring-Size of Metallacyclophanes: A Rational Approach to Molecular Pentagons, *J. Am Chem. Soc.*, **123**, 773-774
- Onggo, D. and Goodwin, H. A, (2002). Sintesis Padatan Kompleks besi(II)-2,2'-bithiazole, *Prosiding Seminar Kimia Bersama*, UKM-ITB ke 5, Melaka, Malaysia., 45-50

Modifikasi Pati Tapioka Dengan Asam Akrilat Dan Akrilamida Sebagai Flokulan

Endang Asijati W.¹⁾, Winda Puspitasari²⁾, Yanti Sabarinah S³⁾

1). Kimia, Universitas Indonesia
Depok, Indonesia

e-mail: asijati @ makara.cso.ui.ac.id

2). Kimia, Universitas Indonesia
Depok, Indonesia

3). P3TIR-BATAN

Pasar Jumat, Jakarta

e-mail: yantis @ indosat.net.id

Abstrak

Modifikasi tepung tapioka untuk dimanfaatkan sebagai flokulan yang dapat mengalami biodegradasi dilakukan dengan mencangkakan (*grafting*) monomer asam akrilat (AA), akrilamida (AAM) dan campuran keduanya dengan berbagai komposisi. Inisiasi dilakukan dengan radiasi pengion menggunakan metoda prairadiasi dalam udara. Proses pencangkakan monomer dilakukan dalam atmosfer nitrogen. Pengaruh komposisi pelarut, dosis total dan konsentrasi monomer dipelajari terhadap persen kopolimer yang dihasilkan. Pencangkakan dilakukan pada suhu 50 °C selama 1 jam. Kopolimer dipisahkan dengan pencucian dan hidrolisis menggunakan HCl. Pengujian sifat kopolimer sebagai flokulan dilakukan dengan menggunakan koloid kaolin 0.25 %. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kondisi optimum pencangkakan diperoleh pada dosis total 7.5 kGy, konsentrasi monomer 30 % dalam pelarut 30 % metanol dalam air. Kadar kopolimer yang diperoleh adalah 4.72 % dan 4.74 % masing-masing untuk P-g-AA (pati tercangkok oleh asam akrilat) dan P-g-AAM (pati tercangkok oleh akril amida). Pencangkakan yang dilakukan dengan campuran asam akrilat 30 % dan akrilamida 30 % dengan perbandingan 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 dan 9:1 menunjukkan adanya kenaikan hasil pencangkakan 13.31 – 22.22 %. Karakterisasi menggunakan spektroskopi FTIR menunjukkan terbentuknya pati termodifikasi, P-g-AA, P-g-AAM dan P-g-AAAM (pati tercangkok oleh akril amida dan asam akrilat). Pengujian sifat flokulasi kopolimer pada pH 3.5 – 6.0 menunjukkan bahwa P-g-AAM merupakan flokulan koloid kaolin yang efektif dibandingkan dengan P-g-AA dan P-g-AAAM pada berbagai komposisi.

Kata kunci: akrilamida, asam akrilat, flokulasi, iradiasi pati, kopolimerisasi cangkok

1. Pendahuluan

Kopolimerisasi cangkok (*graft copolymerization*) merupakan suatu teknik yang penting untuk memodifikasi sifat-sifat fisika maupun kimia polimer, baik polimer alami maupun polimer sintetik. Kopolimerisasi ini dapat diinisiasi dengan cara kimia, radiasi maupun termal. Teknik radiasi dengan menggunakan radiasi pengion mempunyai keunggulan dapat digunakan pada berbagai geometri substrat, bebas residu inisiator, dapat

dilakukan pada sekitar suhu ruang dan kondisi dapat diatur dengan lebih mudah.

Pati merupakan polimer alami yang mudah mengalami biodegradasi. Modifikasi pati dapat dilakukan dengan teknik radiasi (Fanta et al., 1980; Kiatkamjornwong et al., 1997, 2000), walaupun pati termasuk jenis polimer yang dapat terdegradasi oleh radiasi. Melalui modifikasi, pati dapat dimanfaatkan sebagai adsorben (Fanta et al., 1980; Kiatkamjornwong

et al., 1997, 2000), penukar ion (Khalil et al., 1998), flokulan (Rath et al., 1997), dan *sizing agent* untuk tekstil (Mostofa, 1995)

Modifikasi pati melalui pencangkakan monomer dan campuran monomer diharapkan menghasilkan kopolimer yang bersifat netral polielektrolit maupun zwitter ion. Melalui modifikasi ini kopolimer yang dihasilkan diharapkan dapat berperan sebagai flokulan yang selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk penjernihan air.

Penelitian ini bertujuan untuk memodifikasi pati tapioka dengan mencangkakan monomer asam akrilat, akrilamida, dan campuran keduanya pada berbagai komposisi untuk dimanfaatkan sebagai flokulan. Optimasi kondisi pencangkakan dilakukan dengan mempelajari pengaruh komposisi pelarut, dosis serap total dan konsentrasi monomer. Selanjutnya kopolimer yang dihasilkan diuji sifatnya sebagai flokulan dengan menggunakan larutan 0.25 % kaolin dalam air.

2. Percobaan

2.1. Pencangkakan Pati

Sebelum pencangkakan dimulai, tepung tapioka dengan merk Alini sebanyak 5 gr dimasukkan ke dalam plastik dan ditutup rapat. Sampel ini selanjutnya diiradiasi dengan sinar- γ (Co-60) dengan dosis tertentu. Larutan asam akrilat dan akrilamida masing-masing dibuat dengan melarutkan asam akrilat pekat atau padatan akrilamida dalam pelarut 30 % metanol-air. Larutan asam akrilat dan akrilamida dibuat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 % (% v/v). Campuran monomer asam akrilat dan akrilamida dibuat dengan berbagai perbandingan volume larutan asam akrilat : akrilamida (1 : 9, 7 : 3, 1 : 1, 3 : 7 dan 9 : 1). Selanjutnya sampel pati yang telah diiradiasi direndam dalam 40 mL larutan monomer dalam ampul. Pencangkakan dilakukan pada temperatur 50°C selama 60 menit sambil dialiri gas nitrogen selama reaksi berlangsung. Selanjutnya P-g-AA dicuci dengan larutan etanol : air (4 : 1), P-g-AAm dengan larutan metanol : air (1 : 1), dan P-g-AAmAA dengan etanol : air (4:1). Setelah bersih dari homopolimer, kopolimer disaring dan dikeringkan dalam oven vakum pada temperatur 50-60°C.

2.2. Pengaruh Komposisi Pelarut

Pengaruh pelarut dipelajari dengan menggunakan larutan 0 %, 10 %, 30 % dan 50 % metanol dalam air. Pencangkakan dilakukan pada dosis total 10 kGy dan konsentrasi akrilamida 30 %.

2.3. Penentuan kadar kopolimer

Pati tercangkok dipisahkan dari pati yang tidak tercangkok dengan merefluksnya dalam 50 mL HCl 1.5 M selama 2 jam. Pati yang tidak terhidrolisis disaring, dicuci dengan air, dan dikeringkan. Pati yang tidak terhidrolisis merupakan pati tercangkok (kopolimer).

Persen kopolimer = (berat kopolimer/berat substrat awal) X 100%

2.4. Analisis FTIR

Sampel pati asli, pati tercangkok, dan kopolimer masing-masing dicampur dengan serbuk KBr, digerus sampai menjadi bubuk yang halus dan merata. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam sampel.

2.5. Pengujian sebagai Flokulan

Larutan suspensi yang digunakan adalah suspensi kaolin 0,25% dengan pH 3,5; 5,3; dan 6,0. Konsentrasi flokulan divariasikan antara 5-100 ppm. Campuran flokulan dan suspensi diaduk 1 menit dengan kecepatan 80 rpm, dilanjutkan dengan 20 rpm pada 5 menit berikutnya. Campuran didiamkan 10 menit, kemudian larutan di atasnya diukur kekeruhannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 420 nm. (Rath et al., 1997)

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, pemilihan komposisi pelarut dan dosis total dipelajari dengan menggunakan monomer akrilamida. Pemilihan pelarut bertujuan untuk memperoleh kompatibilitas monomer dengan pelarut dan kemampuan mengembangnya pati. Pengaruh dosis berhubungan dengan jumlah pusat aktif dan degradasi pati. Optimasi kondisi pencangkakan selanjutnya dilakukan dengan memvariasi konsentrasi monomer asam akrilat dan akrilamida.

3.1. Pengaruh komposisi pelarut

Air merupakan pelarut yang baik untuk asam akrilat dan akrilamida. Namun, pemakaian air sebagai pelarut mengakibatkan tingginya

homopolimer yang terbentuk. Penambahan metanol selain dapat mengurangi homopolimer juga dapat meningkatkan pengembangan pati. Pengaruh komposisi campuran pelarut metanol-air menunjukkan bahwa persen kopolimer tertinggi diperoleh pada larutan dengan konsentrasi metanol 30 %.

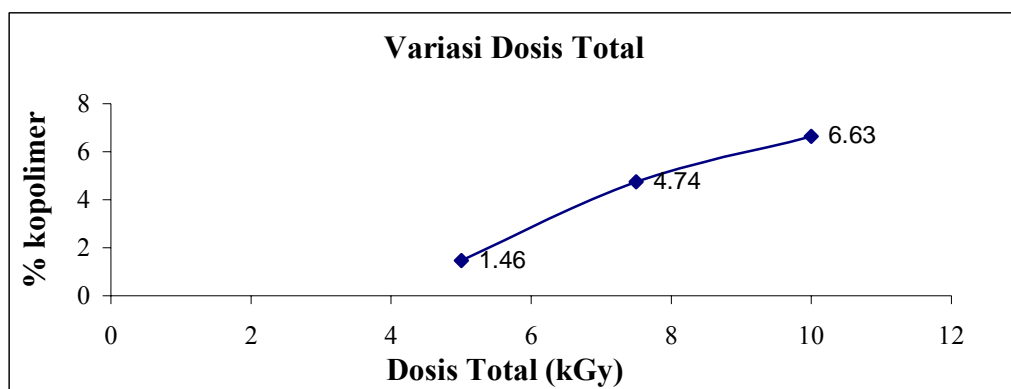
3.2. Pengaruh dosis total

Dosis total berpengaruh terhadap jumlah pusat aktif yang terbentuk pada pati. Makin tinggi dosis total makin tinggi jumlah pusat aktif yang terbentuk. Hasil yang diperoleh pada Gambar 1 menunjukkan kenaikan persen kopolimer tidak linear dengan dosis total yang digunakan. Hal ini disebabkan penggunaan dosis total yang tinggi, selain menyebabkan meningkatnya jumlah pusat aktif juga menyebabkan terjadinya degradasi pati. Oleh karenanya walaupun hasil kopolimerisasi dengan dosis total 10 kGy lebih tinggi, namun untuk percobaan selanjutnya digunakan dosis total 7.5 kGy

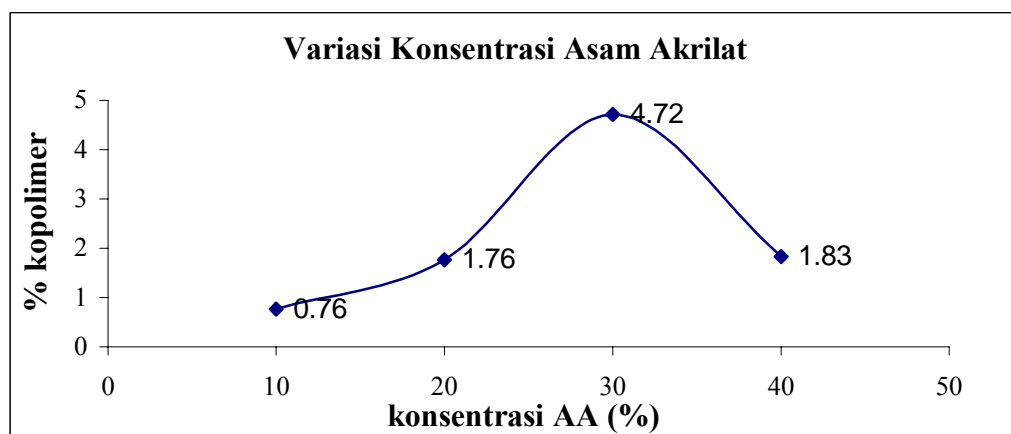
3.3. Pengaruh konsentrasi monomer

Kenaikan konsentrasi monomer selain meningkatkan difusi monomer ke dalam matriks pati juga meningkatkan probabilitas pembentukan homopolimer. Adanya kompetisi antara pencangkakan monomer pada pati dengan pembentukan homopolimer menghasilkan kondisi optimum pencangkakan. Pengaruh kenaikan konsentrasi monomer asam akrilat dan akrilamida terdapat pada Gambar 2 dan 3

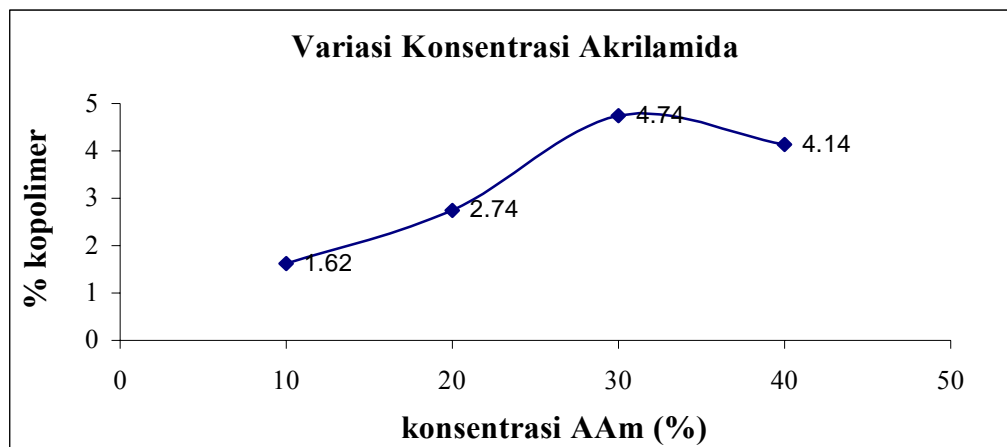
Dari hasil tersebut dapat disimpulkan konsentrasi optimum pencangkakan untuk kedua monomer adalah 30 %. Ini berarti kedua monomer tersebut mempunyai kereaktifan yang tidak berbeda terhadap pencangkakannya pada pati. Berdasarkan hasil ini, kondisi optimum pencangkakan asam akrilat maupun akrilamida adalah dosis total 7.5 kGy, konsentrasi monomer 30 % dalam pelarut 30 % metanol-air.



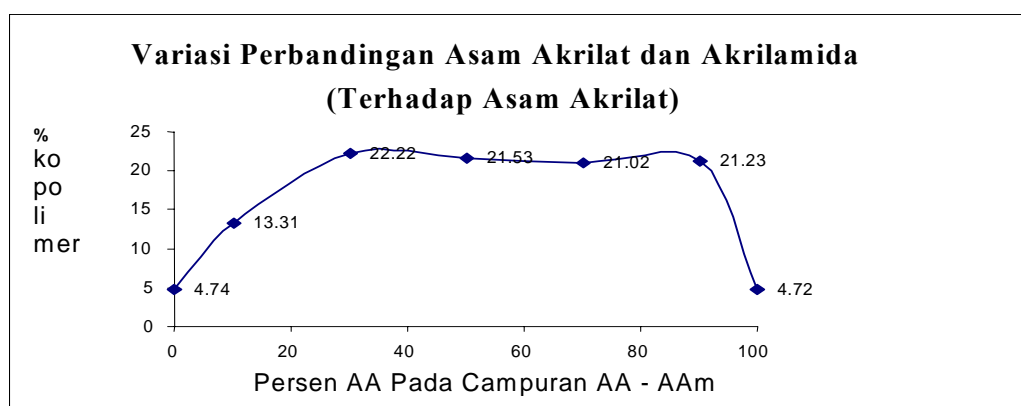
Gambar 1. Pengaruh dosis total terhadap hasil pencangkakan (suhu 50 °C, waktu 1 jam, konsentrasi akrilamida 30 % dalam pelarut 30 % metanol-air)



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi asam akrilat terhadap hasil Pencangkakan (dosis total 7.5 kGy, suhu 50 °C, waktu 1 jam, pelarut 30% metanol-air)



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi akrilamida terhadap hasil pencangkakan (dosis total 7.5 kGy, suhu 50 °C, waktu 1 jam, pelarut 30% metanol-air)



Gambar 4. Pengaruh campuran asam akrilat dan akrilamida terhadap hasil pencangkakan (dosis total 7.5 kGy, suhu 50 °C, waktu 1 jam, pelarut 30 %metanol-air)

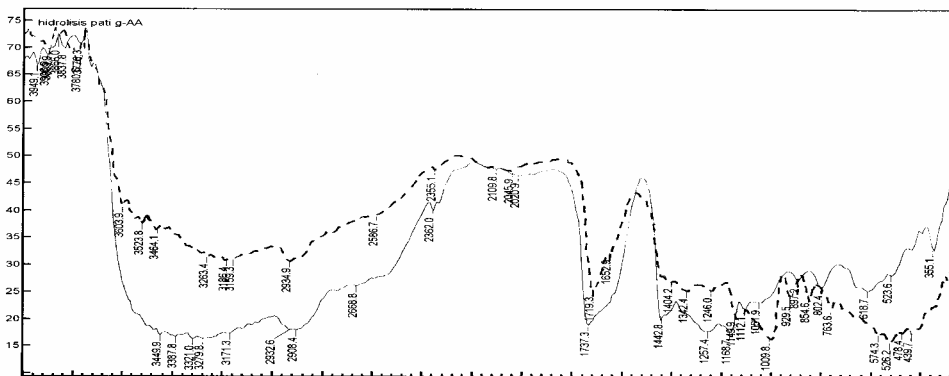
3.4. Pencangkakan campuran monomer

Pencangkakan campuran monomer asam akrilat dan akrilamida dilakukan pada berbagai perbandingan konsentrasi (0:10; 1:9; 3:7; 5:5; 7:3 dan 10:0). Hasil yang diperoleh pada Gambar 4 menyatakan adanya peningkatan kopolimer yang dihasilkan dengan meningkatnya konsentrasi asam akrilat sampai 30 persen. Penambahan selanjutnya sampai 90 persen asam akrilat tidak merubah persen kopolimer yang terbentuk. Ini berarti panjang rantai tercangkok pada pusat aktif yang sama tidak berbeda, tetapi dengan komposisi kopolimer cangkok bervariasi. Tingginya persen kopolimer yang diperoleh pada campuran monomer bila dibandingkan dengan monomer tunggal, disebabkan oleh terbentuknya kopolimer antara asam akrilat dengan akrilamida yang tercangkok. Dengan meningkatnya konsentrasi asam akrilat

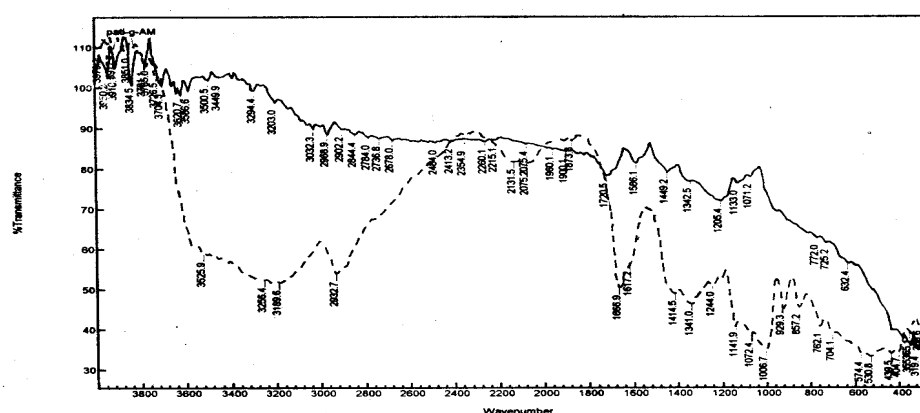
diharapkan lebih banyak gugus karboksilat terdapat pada kopolimer tercangkok. Konstanta propagasi akrilamida lebih besar daripada konstanta propagasi asam akrilat (Grulke, 1994). Dengan demikian pada pencangkakan dengan komposisi akrilamida yang lebih tinggi diharapkan kopolimer tercangkok mempunyai komposisi poliakrilamida yang lebih tinggi daripada poliakrilat. Sebaliknya pada konsentrasi akrilat yang lebih tinggi, diharapkan kopolimer tercangkok lebih dominan mengandung poliakrilat dengan rantai poliakrilamida yang lebih panjang

3.5. Analisis FTIR

Untuk memisahkan pati tercangkok dan pati tidak tercangkok dilakukan hidrolisis dengan HCl. Spektrum FTIR pati tercangkok dengan asam akrilat dan akrilamida sebelum dan sesudah hidrolisis dengan HCL terdapat pada



Gambar 5. Spektrum FTIR P-g-AA sebelum dan sesudah hidrolisis dengan HCl



Gambar 6. Spektrum FTIR P-g-AAm sebelum dan sesudah hidrolisis dengan HCl

Gambar 5 dan Gambar 6. Dari gambar 5 terlihat bahwa P-g-AA sebelum dan sesudah hidrolisis keduanya mempunyai daerah serapan utama serupa. Serapan pada $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan daerah serapan OH, dan serapan pada 1737 cm^{-1} merupakan puncak gugus karbonil dari asam karboksilat tetap ada pada kedua spektrum. Namun setelah hidrolisis, puncak serapan khas dari gugus C – O pati, yaitu pada daerah $1140 - 1000 \text{ cm}^{-1}$, tidak terdapat lagi yang menunjukkan adanya hidrolisis dari pati tidak tercangkok.

Berbeda dengan spektrum P-g-AA, pada hidrolisis P-g-AAm terdapat perbedaan yang berarti pada pati sebelum dan sesudah hidrolisis. Sebelum hidrolisis terlihat adanya serapan pada daerah $3500 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan stretching –NH dari akrilamida yang tumpang tindih dengan serapan –OH dari pati. Pada $1675,2 \text{ cm}^{-1}$ dan $1596,8 \text{ cm}^{-1}$ terdapat serapan gugus –C=O dan vibrasi tekuk amina (-NH). Pada daerah $1140 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ terdapat serapan –C-O dari pati.

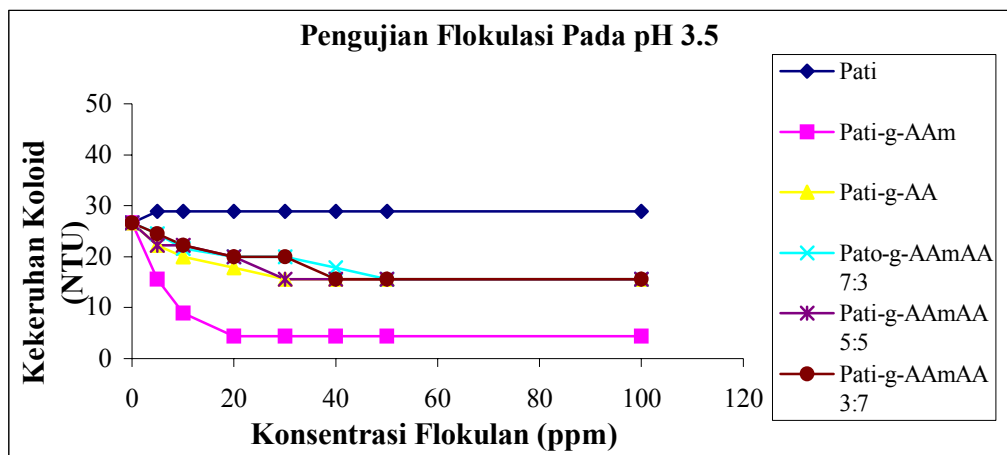
Setelah hidrolisis, terdapat puncak serapan pada $1720,5 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan gugus karbonil asam karboksilat dan serapan yang melebar pada daerah 3500 cm^{-1} yang merupakan serapan dari OH. Ini berarti telah terjadi hidrolisis sebagian dari gugus amida menjadi gugus karboksilat. Setelah hidrolisis juga terdapat perubahan serapan pada daerah $1140 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan daerah stretching ikatan C – O pati

3.6. Uji Flokulasi

Pengujian pati tercangkok sebagai flokulan dilakukan dengan menggunakan koloid kaolin. Pengujian dilakukan dengan menggunakan P-g-AAm, P-g-AA, P-g-AAmAA 7:3, P-g-AAmAA 5:5 dan P-g-AAmAA 3:7 dengan pati tidak termodifikasi sebagai blanko. Kopolimer pati dengan akrilamida diharapkan menghasilkan polimer non ionik (tidak bermuatan), sedangkan kopolimer pati dengan asam akrilat merupakan polimer anionik (bermuatan negatif) pada daerah pH netral. Kopolimer pati dengan struktur bercabang diharapkan lebih



Gambar 7. Approach-ability kontaminan pada flokulan polimer: a. kopolimer cangkok, b. polimer linier. (Singh et al., 2000)



Gambar 8. Hasil uji flokulasi pati tercangkok pada pH 3,5

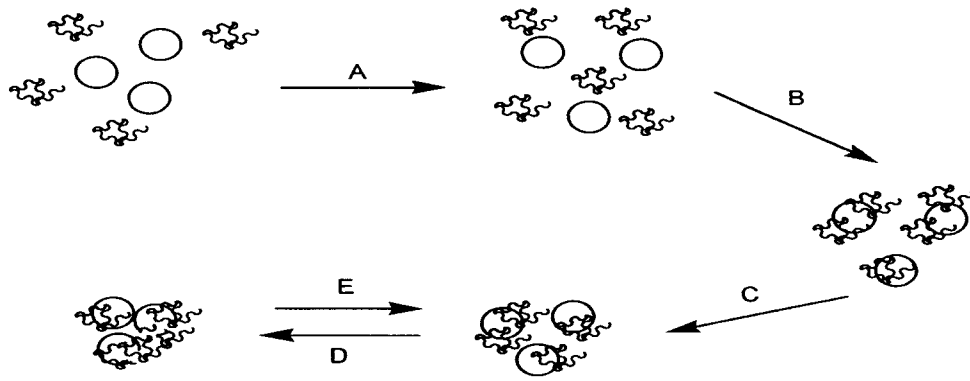
efektif sebagai flokulan dibandingkan dengan struktur yang linier (Gambar 7).

Uji Flokulasi pada pH 3.5 menunjukkan terjadi penurunan kekeruhan, terutama dengan penambahan P-g-AAm. Penambahan P-g-AA dapat menurunkan kekeruhan meskipun tidak seefisien P-g-AAm. Pengaruh adanya gugus akrilat pada gugus amida menurunkan efisiensinya sebagai flokulan. Pada pH tersebut baik koloid kaolin maupun kopolimer dengan berbagai komposisi cenderung tidak bermuatan. Dengan demikian penurunan kekeruhan dimungkinkan akibat terjadinya adsorpsi partikel koloid oleh polimer yang menyebabkan destabilisasi koloid. Sementara itu, bagian lain dari polimer akan mengadsorpsi partikel koloid lain, membentuk flok. Mekanisme flokulasi diduga berlangsung melalui pembentukan flokulasi jembatan (Gambar 9). Flokulasi jembatan terjadi karena satu rantai polimer dapat mengadsorpsi lebih dari satu partikel dan menyebabkan bersatunya partikel-partikel tersebut. Proses flokulasi melalui pembentukan jembatan, mengikutsertakan tahapan-tahapan yang kompleks seperti pencampuran polimer,

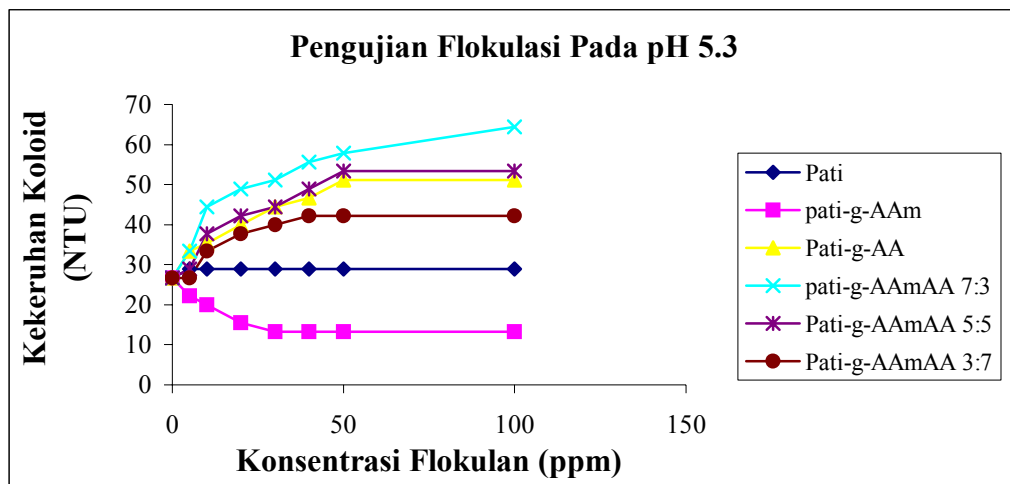
adsorpsi polimer, rekonformasi polimer dan pembentukan flok (Elimelich et al., 1995).

P-g-AAm dan P-g-AA dengan panjang rantai tercangkok yang tidak terlalu panjang (berdasarkan persen kopolimer) menunjukkan sifat sebagai flokulan pada daerah asam. P-g-AAm lebih efektif daripada P-g-AA. Ini menunjukkan gugus fungsi lebih berperan dalam menentukan efisiensi flokulasi. P-g-AAmAA dengan rantai tercangkok yang lebih panjang menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan pati P-g-AA dengan rantai yang lebih pendek. Ini berarti panjang rantai tercangkok kurang berperan dibandingkan dengan jenis gugus fungsi. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan satu macam monomer akrilamida (Singh, 2000), kopolimer cangkok dengan jumlah rantai yang lebih sedikit tetapi lebih panjang merupakan flokulan yang lebih efektif.

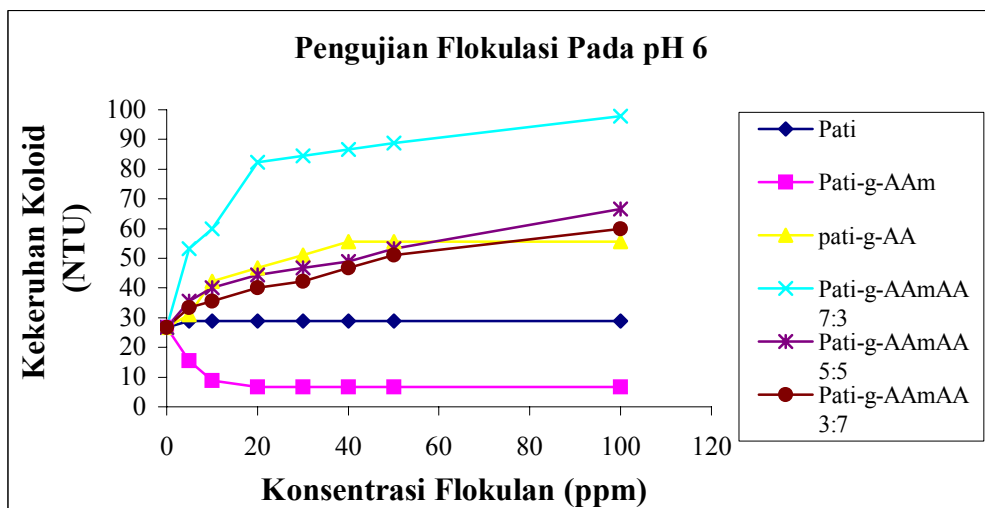
Uji flokulasi pada pH 5.3 dan 6.0 menggunakan pati tercangkok dengan berbagai komposisi menghasilkan kecenderungan yang sama. Namun, pada kedua pH hanya P-g-AAm yang



Gambar 9. Pembentukan jembatan untuk destabilisasi koloid oleh polimer. (Elimelich et al., 1995)



Gambar 10. Hasil uji flokulasi pati tercangkok pada pH 5,3



Gambar 11. Hasil uji flokulasi pati tercangkok pada pH 6.0

dapat menurunkan kekeruhan melalui pembentukan flok. P-g-AA pada pH tinggi cenderung bermuatan negatif dan menstabilkan koloid yang terlihat dengan meningkatnya kekeruhan. Penambahan asam akrilat pada pencangkokan akrilamida meningkatkan kekeruhan. Dari gambar tersebut dapat dilihat dengan bertambahnya gugus amida

pada P-g-AAmAA kekeruhan semakin meningkat terutama pada pH tinggi. Adanya gugus karboksilat pada kopolimer akrilamida tercangkok cenderung menstabilkan koloid. Dengan berkurangnya konsentrasi asam akrilat pada kopolimer tercangkok, berarti bentuk anion dari gugus karboksilat berkurang dan menyebabkan muatan negatif pati tercangkok berkurang. Hal ini menyebabkan meningkatnya proses adsorpsi dan rekonformasi polimer yang berakibat meningkatkan kekeruhan. Kesimpulan ini diperkuat dari data P-g-AAm yang walaupun sebagian gugus amida terhidrolisis menjadi karboksilat tetapi tetap menampilkan sifatnya sebagai flokulan. Dari hasil ini memperkuat kenyataan bahwa hanya sebagian kecil saja gugus akrilamida dari P-g-AAm yang terhidrolisis menjadi karboksilat.

4. Kesimpulan

Sifat flokulasi terhadap koloid kaolin lebih ditentukan oleh gugus fungsional pada panjang rantai tercangkok. Pencangkakan gugus amida pada pati dapat mengefektifkan pati sebagai flokulan.

5. Daftar Pustaka

Elimelich M., Gregory J., Jia X., Williams R., (1995). *Particle Deposition and Aggregation : Measurement, Modelling and Simulation*, Butterworth-Heinemann, Oxford.

Fanta G.F., Burr R.C., Doane W.M., (1980). *Polymerization of Alkyl Acrylates and Alkyl*

Methacrylates with starch. J. applied Polymer Sci, vol. 25, Hal. 2285-2294.

Grulke E.A., (1994). *Polymer Process Engineering*. PTR Prentice Hall, Inc., New Jersey.

Khalil M.I., Farag S., (1998). Utilization of Some Derivates in Heavy Metal Ions Removal. *J. Applied Polymer Science*, vol. 69, hal. 45-50.

Kiatkamjornwong S., Chomsaksakul S.W., Sonsuk M., (2000). Radiation Modification of water Absorption of Cassava Starch by Acrylic Acid/Acrylamide. *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 59, hal. 413-427.

Kiatkamjornwong S., Meechai N., (1997). Enhancement of The Grafting performance of The Water Absorption of Cassava Starch Graft Copolymer by gamma Radiation. *Radiation Physics Chemistry*, vol. 49, hal. 689-696.

Mostafa M.K.H., (1995). Graft Copolymerization of Starch-AN Initiated by Potassium Permanganate. *J. Applied Polymer Science*, vol. 56, hal. 263-269.

Rath & Singh. (1997). Flocculation Characterization of grafted and Ungrafted Starch, amylose and Amylopectin. *J. Applied Polymer Science*, vol. 66, hal. 1729.

Singh R.P., Tripathy T., Karmakar G.P., Rath S.K., Karmakar N.C., Pandey S.R., Kannan K., Jain S.K., Lan N.T., (2000). Novel Biodegradable Flocculants Based on Polysaccharides, *Current Science*, vol. 78, no 7, hal. 798-803.

Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Pembentukan 5-Hidroksimetil Furfural dalam Larutan Sirup Fruktosa

Endang Saepudin*, Muhamat Syahroni

* Departemen Kimia, FMIPA-Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia
e-mail: saepudin1@ui.edu

Abstrak

Proses degradasi pada produk-produk makanan yang terjadi selama proses pembuatan ataupun penyimpanan, merupakan masalah yang penting di dalam industri makanan. Proses degradasi ini menyebabkan menurunnya kualitas maupun kuantitas dari produk tersebut. Terbentuknya senyawa 5-hidroksimetil furfural (HMF) pada produk-produk gula seperti sukrosa, manisan kaleng, dan HFS (high Fructose Syrup), merupakan salah satu penyebab menurunnya kualitas produk-produk tersebut. Hal ini ditandai dengan munculnya warna kecoklatan pada produk yang berpengaruh pada menurunnya kualitas tampilan maupun kandungan nutrisi dari produk yang dihasilkan. Proses pencoklatan (browning) dapat terjadi melalui dua mekanisme yang berbeda, yaitu secara enzimatik dan non-enzimatik. Penelitian yang dilakukan sebelumnya, menunjukkan bahwa ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} tidak berpengaruh secara nyata terhadap pembentukan HMF, Sedangkan ion Fe^{3+} dan Cu^{2+} menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap pembentukan HMF. Penelitian ini bertujuan untuk melihat proses pencoklatan secara non-enzimatik, yaitu pengaruh ion-ion logam Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , dan Sn^{2+} terhadap pembentukan HMF dalam high fructose syrup. Penentuan HMF dilakukan dengan HPLC dengan detektor UV pada panjang gelombang 280 nm, kolom C-18, eluen metanol 10% dengan laju alir 10 mL/menit, dan dilakukan secara isokratik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ion logam Sn^{2+} , terbukti mengkatalisis pembentukan HMF dalam larutan sirup fruktosa, sedangkan ion logam lainnya tidak memberikan pengaruh secara nyata terhadap pembentukan HMF.

Kata kunci: 5-hidroksimetil furfural, HMF, Fruktosa, HFS, .

1. Pendahuluan

Fruktosa merupakan monosakarida yang relatif sedikit ditemukan di alam. Secara alami, fruktosa banyak ditemukan di dalam buah-buahan dan madu, sehingga ia lebih sering disebut gula buah. Fruktosa merupakan gula yang memiliki rasa yang paling manis dibandingkan gula-gula alam lainnya, sehingga banyak digunakan sebagai bahan pemanis di industri makanan dan minuman.

Pada industri pembuatan bahan pemanis, fruktosa dibuat dalam bentuk sirup pekat (High Fructose Syrup) yang memiliki kandungan fruktosa 42 – 85% terhadap berat kering. Penggunaan HFS ini lebih disukai dalam industri makanan, karena tidak memerlukan proses pelarutan seperti yang terjadi pada

sukrosa.

HFS dibuat dari bahan baku pati (tepung tapioka, tepung kentang, ataupun tepung jagung), melalui 3 tahap proses enzimatik. Tahap pertama disebut likuifikasi, dimana pati dilarutkan dalam air panas dan dicampur dengan enzim α -amilase (EC 3.2.1.1, α -1,4-glukan glukonohidrolase). Pada tahap ini terjadi hidrolisis secara acak sehingga dihasilkan campuran glukosa, maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida lainnya. Tahap berikutnya adalah tahap sakarifikasi yang menggunakan enzim glukoamilase (EC 3.2.1.3, α -1,4-glukan glukano-hidrolase). Proses sakarifikasi terjadi secara optimal pada pH 4,5 menghasilkan sirup glukosa 95–98%. Tahap ke tiga adalah proses isomerisasi dengan menggunakan enzim glukoisomerase yang akan merubah glukosa

menjadi isomernya yaitu fruktosa. Hasil dari tahapan ini adalah high fructose syrup dengan kandungan fruktosa maksimum 45% terhadap berat kering.

Dalam proses pembuatan dan penyimpanan, produk-produk makanan yang komposisi utamanya karbohidrat, seperti: roti, susu, sukrosa, sirup fruktosa (HFS), rentan terhadap reaksi degradasi dari gula/karbohidrat. Hasil dari degradasi gula tersebut adalah menurunnya kualitas penampilan produk, berupa perubahan warna, serta kandungan nutrisi produk makanan tersebut. Akan tetapi, pada beberapa produk makanan, reaksi pencoklatan merupakan salah satu tahapan penting di dalam proses produksi, contohnya pada perusahaan kopi, the, bir, dan roti. Reaksi pencoklatan akan meningkatkan penampilan dan rasa dari produk-produk tersebut. Agar reaksi pencoklatan dapat dikontrol dalam batas yang tidak merugikan, maka sangatlah penting untuk mengetahui mekanisme reaksi yang terjadi.

Terdapat beberapa mekanisme pencoklatan dalam makanan (ACS Symposium, 1996), antara lain, reaksi Maillard, yaitu reaksi pencoklatan akibat terjadinya reaksi kondensasi antara gugus amina dari asam amino atau protein dengan gugus karbonil dari karbohidrat. Reaksi lainnya adalah karamelisasi, yaitu reaksi pencoklatan akibat pengaruh panas yang menyebabkan terdekomposisinya molekul gula. Karamelisasi dipercepat bila larutan yang dipanaskan memiliki pH asam, atau terdapat ion-ion logam tertentu. Diduga mekanisme yang terjadi, terutama pada ion logam transisi, melibatkan transfer elektron yang mempercepat terjadinya dehidrasi gula.

Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki pengaruh ion logam Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , dan Sn^{2+} terhadap pembentukan 5-hidroksimetil furfural (HMF) dalam produksi high fructose syrup (HFS).

2. Percobaan

Pembuatan larutan sampel untuk analisis

Sirup fruktosa 55% dengan konsentrasi Brix 77 (77% gula + 23% air) diperoleh dari PT. Puncak Gunung Mas, Jl. Raya Poncol, Ciracas, Jakarta timur. Gula yang terkandung dalam sirup ini terdiri dari 55% fruktosa, 41% glukosa, dan 4% oligosakarida. Sirup diencerkan dengan menggunakan air demin

sampai diperoleh larutan dengan kepekatan Brix 20 (refraktometer). Larutan yang diperoleh kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 42, selanjutnya diukur pH dan konduktivitasnya dengan pH meter dan konduktometer. Larutan ini selanjutnya disebut larutan sampel.

Pengukuran kadar N total dalam HFS

Ke dalam labu Kyeldahl, dimasukkan 1 g HFS Brix 77, sejumlah kecil kristal $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dan Na_2SO_4 , serta larutan H_2SO_4 pekat sebanyak 10 mL. Campuran dipanaskan diatas hot plate pada temperatur tinggi sampai diperoleh larutan jernih. Larutan kemudian didinginkan dan diencerkan dengan air bebas NH_3 sampai 25 mL. Selanjutnya larutan dibasakan dengan penambahan NaOH pekat dan secara cepat didestilasi, destilat ditampung dalam larutan HCl 0,2 M. Garam amonium yang diperoleh dititrasi dengan larutan NaOH 0,2 M menggunakan indikator fenolftalein.

Larutan standar HMF

Larutan standar HMF 100 ppm dibuat dengan melarutkan 0,01 g HMF 99% (Aldrich) dengan air demin hingga volumenya menjadi 100 mL. Larutan standar HMF 5; 10; 20; dan 40 ppm dibuat dengan cara memipet 2,5; 5; 10; dan 20 mL larutan standar 100 ppm dan diencerkan dengan air demin hingga volumenya menjadi 50 mL. Larutan HMF disiapkan setiap minggu dan disimpan pada suhu 4 °C.

Pengaruh pH terhadap pembentukan HMF dalam sampel

Larutan sampel diatur pHnya sampai diperoleh larutan dengan pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Masing-masing larutan kemudian diambil sebanyak 10 mL, lalu dipanaskan selama 60 menit pada suhu 80 °C. Larutan yang diperoleh kemudian diukur menggunakan HPLC dengan metode standar eksternal, menggunakan pelarut metanol : air (4 : 6), elusi isokratik, laju alir 1 mL/menit, pada λ maksimum 280 nm, dan kolom C-18.

Pengaruh waktu pemanasan terhadap pembentukan HMF dalam sampel

Larutan sampel diatur pHnya dengan penambahan buffer pH 4 menggunakan pH meter sampai diperoleh larutan dengan pH 4. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 80 °C selama 0, 60, 120, dan 180 menit. Masing-masing larutan diukur kandungan HMFnya dengan menggunakan HPLC dengan metode

standar eksternal, menggunakan pelarut metanol : air (4 : 6), elusi isokratik, laju alir 1 mL/menit, pada λ maksimum 280 nm, dan kolom C-18.

Pengaruh ion logam terhadap pembentukan HMF dalam sampel

Ion-ion logam Zn^{2+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} dengan konsentrasi 1000 ppm, dibuat dengan cara melarutkan garam $ZnCl_2$, $SnCl_2$, $MnCl_2$, dan $CrCl_3$ sebanyak 0,1 g dalam air, kemudian diencerkan hingga volumenya menjadi 100 mL. Sebanyak 2,5 mL masing-masing larutan tersebut dipipet ke dalam empat buah erlenmeyer yang mengandung 20 mL larutan sampel lalu diencerkan dengan air demin sampai volumenya menjadi 50 mL, sehingga diperoleh larutan sampel yang mengandung 50 ppm ion logam. Dengan cara yang sama dibuat larutan sampel yang mengandung 0; 10; 20; 30 dan 40 ppm ion-ion logam di atas dengan cara menambahkan 0; 0,5; 1; 1,5; dan 2,0 mL larutan ion logam ke dalam sampel. pH larutan diatur sedemikian rupa, sehingga semua larutan sampel memiliki pH 4. Larutan-larutan tersebut kemudian dipanaskan selama 60 menit pada 80 °C dan diukur dengan HPLC.

3. Hasil dan pembahasan

Pencoklatan yang disebabkan reaksi Maillard membutuhkan adanya senyawa dengan gugus amina bebas. Pengukuran kandungan N total dimaksudkan untuk memastikan apakah reaksi Maillard atau reaksi karamelisasi yang beroperasi dalam reaksi pencoklatan.

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar N total sebesar 0,21%. Ini menunjukkan bahwa kandungan protein dalam sampel berkisar di sekitar 1,3%. Dengan demikian, dapat diduga bahwa proses pencoklatan dapat terjadi melalui reaksi karamelisasi ataupun reaksi Maillard.

Pengaruh pH Terhadap Pembentukan HMF.

Data yang didapat menunjukkan bahwa konsentrasi HMF bertambah dengan menurunnya pH larutan (**Gambar 1**). Hasil sesuai dengan mekanisme reaksi Maillard (Bekum *et al* 1985), bahwa mekanisme pembentukan HMF di dalam reaksi Maillard optimum terjadi pada suasana asam.

Pada pH 3, konsentrasi HMF yang terbentuk cukup besar dan turun dengan cukup drastis pada pH 4. Tingginya konsentrasi HMF pada pH 3 terjadi karena pada pH yang sangat asam

(1 – 3) pembentukan HMF pada larutan gula terjadi melalui 2 mekanisme yang berbeda, reaksi Maillard dan reaksi degradasi asam atau karamelisasi. Penelitian yang dilakukan oleh Temink dan Kuster (1977), terhadap proses degradasi asam pada senyawa fruktosa, tidak menemukan adanya pembentukan HMF di atas pH 3,9. Hal ini sesuai dengan data yang diperoleh di mana terjadi penurunan konsentrasi HMF yang cukup besar dari pH 3 ke pH 4.

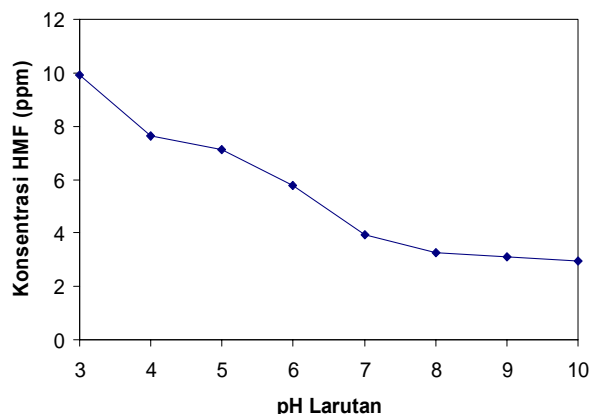
Untuk meminimiliasi pencoklatan akibat pH yang terlalu rendah, sampel-sampel yang digunakan untuk semua percobaan dikondisikan pada pH 4.

Pengaruh waktu pemanasan terhadap pembentukan HMF

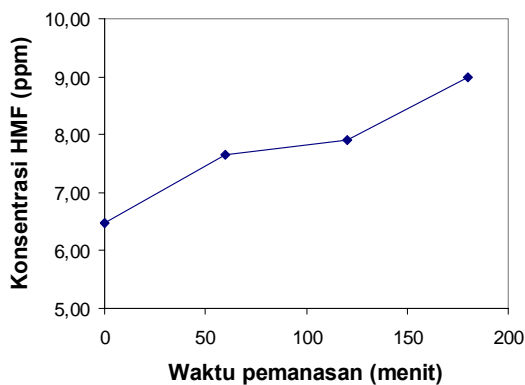
Konsentrasi HMF yang terbentuk di dalam sampel semakin besar dengan bertambahnya waktu pemanasan (**Gambar 2**). Pemanasan gula pada temperatur 80 °C, memang membawa konsekuensi terbentuknya hidroksimetil furfural akibat terjadinya dehidrasi pada gula (**Gambar 3**). Reaksi ini biasanya dimulai melalui tautomerisasi membentuk enediol yang kemudian terjadi pelepasan satu molekul air. Molekul air berikutnya terlepas setelah terbentuk gugus keton dan aldehid akibat terjadinya tautomerisasi keto-enol. Akhirnya terbentuk 5-hidroksimetil furfural melalui proses siklisasi.

Pengaruh Ion-ion Logam

Pengaruh ion-ion logam terhadap pembentukan HMF dalam larutan HFS memberikan hasil seperti terlihat pada **Gambar 4**. Secara umum terlihat bahwa ion-ion logam ini hanya sedikit memberikan pengaruh dalam hal kemampuan mengkatalisis pembentukan HMF. Kadar HMF dalam sampel yang mengandung ion Cr^{3+} memang terlihat jauh lebih tinggi dari sampel-sampel lainnya, akan tetapi kandungan HMF pada larutan kontrolnya (kandungan Cr^{3+} 0 ppm) juga tinggi, sehingga selisih antara larutan kontrol dengan larutan yang mengandung 50 ppm ion Cr^{3+} hanya sebesar 2,27 ppm. Sehingga dapat diperkirakan bahwa ion Cr tidak atau sedikit sekali memberikan pengaruh pada pembentukan HMF. Dengan cara yang sama, kita melihat bahwa ion Mn^{2+} dan Zn^{2+} tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap pembentukan HMF. Data untuk sampel yang mengandung ion Sn^{2+} memberikan hasil yang menunjukkan bahwa



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap pembentukan HMF dalam larutan HFS



Gambar 2. Kurva pengaruh waktu pemanasan terhadap pembentukan HMF dalam larutan HFS.

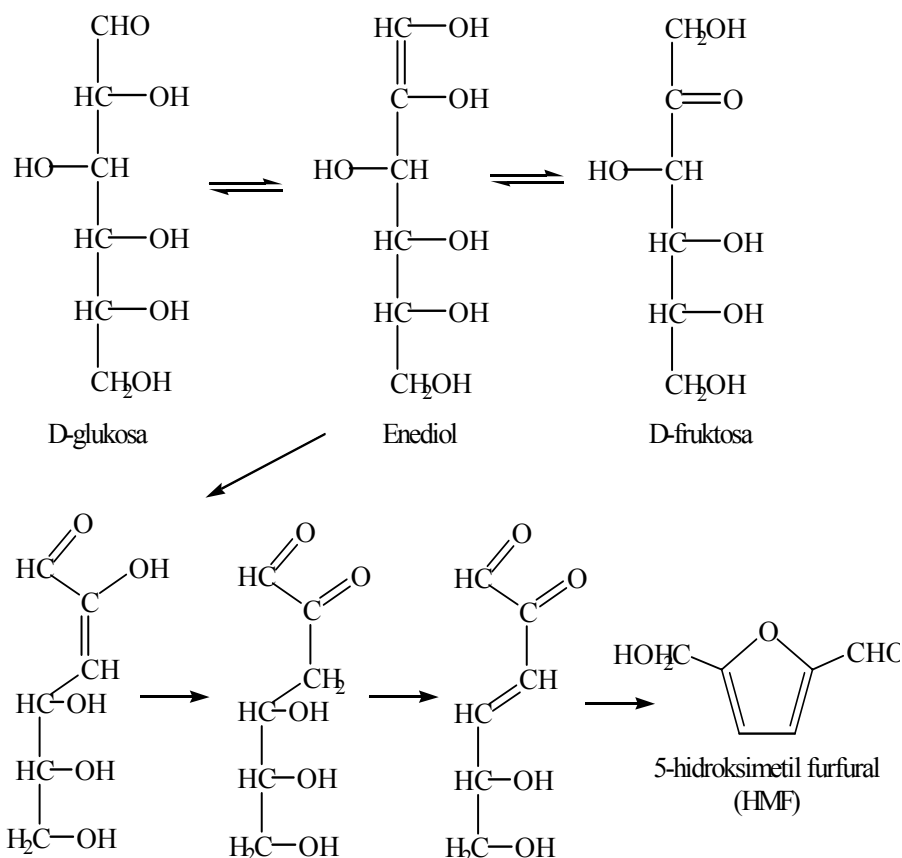
Tabel 1. Pengaruh ion-ion logam terhadap pembentukan 5-hidroksimetil furfural (HMF) dalam sampel high fructose syrup (HFS)

No.	Konsentrasi Ion Logam (ppm)	Konsentrasi HMF (ppm)			
		Zn ²⁺	Mn ²⁺	Cr ³⁺	Mn ²⁺
1.	0	6,99	5,28	30,59	4,16
2.	10	6,37	4,89	30,73	5,81
3.	20	4,61	4,75	27,06	5,85
4.	30	5,65	4,20	30,66	5,92
5.	40	5,65	4,14	31,62	7,00
6.	50	5,06	3,47	32,86	11,23

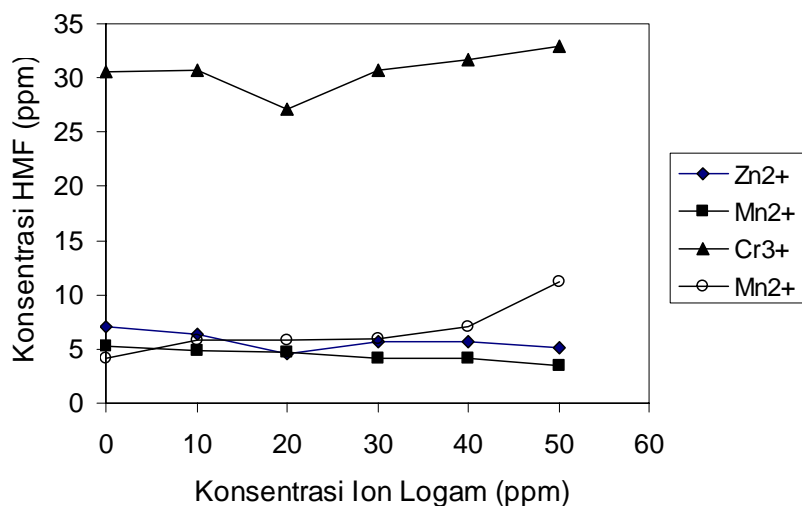
ion Sn²⁺ cukup berpengaruh pada pembentukan HMF, dimana sampel yang mengandung 50 ppm ion Sn²⁺ kandungan HMFnya naik hampir 3 kali lipat dibandingkan dengan kontrolnya (Tabel 1).

Karakteristik dari logam-logam transisi adalah kemampuannya berada dalam keadaan stabil pada beberapa tingkat oksidasi, oleh karena itu logam-logam ini dapat berfungsi sebagai katalis dalam reaksi-reaksi yang melibatkan transfer elektron (Bender dan Brubacer, 1973). Menurut Eskin (ACS Symposium, 1996), ion logam Fe³⁺

lebih efektif mengkatalisis pembentukan HMF di dalam sistem gula dibandingkan dengan Fe²⁺. Hal ini menyiratkan bahwa tahap awal dari proses katalisis tersebut adalah reaksi oksidasi-reduksi antara ion logam dengan senyawa gula pereduksi. Diperkirakan bahwa mekanisme reaksi yang terjadi adalah seperti terlihat pada Gambar 5. Namun demikian masih sulit untuk memprediksi mengapa hal ini tidak terjadi pada ion Cr³⁺ dan Zn²⁺. Masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui karakteristik ion-ion logam ini,



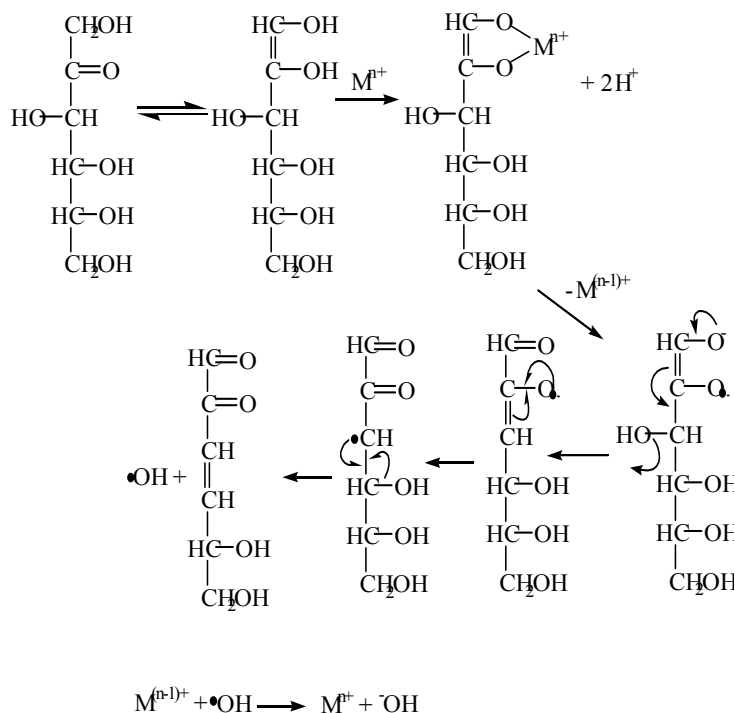
Gambar 4. Mekanisme Dehidrasi Gula Menghasilkan HMF



Gambar 4. Pengaruh Ion-ion Logam terhadap pemebntrukan HMF dalam larutan HFS yang dipanaskan selama 60 menit pada suhu 80 °C.

terutama ion-ion yang sama tetapi memiliki tingkat oksidasi yang berbeda, misal ion Cr⁶⁺ dan Mn⁴⁺ atau Mn⁷⁺. Kesulitan yang mungkin dihadapi adalah karena ion-ion logam ini dikenal bersifat oksidator kuat, sehingga

kemungkinan reaksi berjalan dengan mekanisme yang berbeda.



Gambar 5. Mekanisme degradasi gula menjadi 5-hidroksimetil furfural dengan katalis logam

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa:

- Ion-ion logam Mn^{2+} , Zn^{2+} , dan Cr^{3+} , tidak memberikan efek katalisis yang nyata dalam proses pencoklatan yang diamati melalui indikasi terbentuknya 5-hidroksimetil furfural dalam larutan sirup fruktosa yang dipanaskan pada $80\text{ }^{\circ}C$ dan dimonitor dengan HPLC.
- Ion logam Sn^{2+} , terbukti memberikan efek katalisis terhadap pembentukan 5-hidroksimetil furfural dalam larutan sirup fruktosa.

5. Ucapan terima kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada:

PT. Puncak Gunung Mas, Jl. Raya Poncol, Jakarta, atas penyediaan sirup fruktosa dan dana yang diberikan sehingga terselenggaranya penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

- Bender, M., Brubacer, L.J.: Catalysis and Enzyme Action, Mc Graw-Hill Book Company, New York, 1973.
- Bekum, V.G.M.A., Roels, J.A.: *Starch Conversion Technology*, Marcell Dekker Inc., New York, 1985.
- Erbersdobler, H.F., Hartkoft, J., Keyser, H., Ruttkat, A., Chemical Marker for Protein Quality of Heated and Stored Food, ACS Symposium Series, 631, 44-53, American Chemical Society, 1996.
- Holme, D.J., Peck, H., Analytical Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994.

Biological activities of thiophene-hydrazone and the zinc (II) complexes tested on human normal and cancer cell lines

Endom Ismail¹⁾, Hapipah Mohd Ali²⁾, and Bohari M. Yamin³⁾

¹⁾ School of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Malaysia.
eismail@pkrisc.cc.ukm.my

²⁾ Department of Chemistry, Institute of Biological Science, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.
hapipah@um.edu.my

³⁾ School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Malaysia.
bohari@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

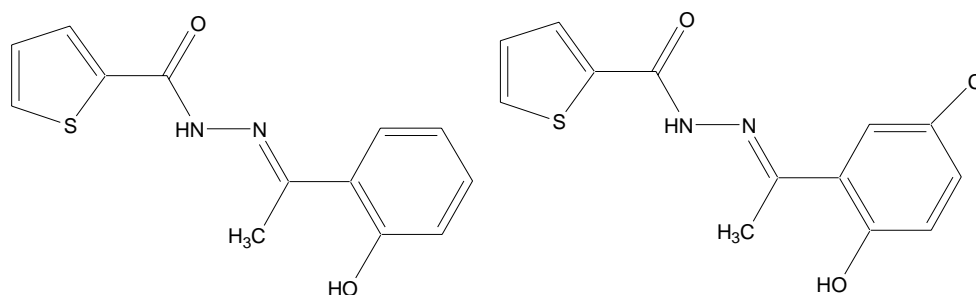
Reaction of thiophene-2-carboxylic hydrazides, with either 2-hydroxyacetophenone (LH) or 5-chloro-2-hydroxyacetophenone (LCl) has lead to formation of two new Schiff bases, thiophene-2-carboxylic hydrazides (LH) and 5-chloro-2-hydroxyacetophenone LCl). Template condensation of LH or LCl and zinc acetate in the presence of triethylamine have produced two new zinc(II) complexes, bis{ μ -O-[1-(2-oxidophenyl)ethylidene]benzohydrazido-bis[(DMSO)-zinc(II)]} (ZnLH) and bis{ μ -O-[1-(5-chloro-2-oxidophenyl)-ethylidene]-thiophene-2-carbohydrazidato}bis-[(pyridine)-zinc(II)] (ZnLCl). The x-ray structure of ZnLCl, the IR, ¹H and ¹³C NMR data indicate that the hydrazone ligands coordinate to zinc centers in a tridentate manner via CN, CO and phenolic OH group. The x-ray crystallographic study of ZnLCl indicates that the complex belongs to a monoclinic system with centrosymmetric dimer atoms via Zn-O bridge. The Schiff bases and the two zinc (II) complexes show strong cytotoxic activities against MCF-7 (human breast cancer cells) and MES-SA (human uterus cancer cells) with IC₅₀ values of 4.5 μ g ml⁻¹ and 9 μ g ml⁻¹ respectively with reference to positive control tamoxifen. Further testing of these compounds with a series of normal cell lines such as MRC-5 (normal lung) and Chang's liver (normal liver) was also being performed.

Keywords: biological activities, Schiff bases, x-ray structure and zinc complexes.

1. Introduction

The nitrogen-oxygen donor multidentate ligands have been investigated systematically since the last century and continue to be an important area of research till today (Swiegers and Malefetse, 2000; Vallina and Stoeckli-Evans, 2002). An easy and inexpensive way of producing these multidentate ligands such as Schiff base ligands is by condensation reaction of an aromatic aldehydes or ketones with aromatic hydrazides. One of the main interest in this synthesis is to prepare ligands or

complexes with a predefined geometry with potential applications such as catalysis, transport process, modeling or with biological applications. Biological activities of complexes derived from hydrazones have been intensively studied such as antibacterial, antitumoral and antimalariala (Tarafder *et al.*, 2001; Haiduc and Silvestru, 1990). To our interest, the antioxidant activity of benzoylhydrazone and their metal complexes, is also included in the biological investigations. Here we described the preparation, structural elucidations and



Thiophene-2-carboxylic acid [1-(2-hydroxy-Phenyl)-ethylidene]-hydrazide and **Thiophene-2-carboxylic acid [5-chloro-2-hydroxy-Phenyl)-ethylidene]-hydrazide**

Fig.1: Thiophene-Hydrazone Schiff base ligands

biological activities of thiophene-2-carboxylic hydrazides with either hydroxyacetophenone or chlorohydroxyacetophenone.

2. Materials and methods

Materials

Thiophene carboxylic hydrazide, 2-hydroxyacetophenone and 5-chloro-2-hydroxyacetophenone, metal acetate, ETOH, Et₂O were used without further purification. Pyridine was pre-dried over activated molecular sieve before use.

Synthesis of ligands

A typical procedure for the preparation of Schiff base ligand is as follows. A solution of 0.1 mol thiophene-2-carboxylic hydrazide in 50 cm³ ethanol was added slowly to a 0.1 mol ethanolic solution of either 2-hydroxyacetophenone (LH) or 5-chloro-2-hydroxyacetophenone (LCl).

Synthesis of complexes

The metal complexes were prepared by mixing the solution of zinc acetate in ethanol with a solution of thiophene carboxylic hydrazide and the corresponding ketone in a 1:2:2 molar ratios with refluxing and stirring. The products formed were filtered and recrystallized from pyridine mixture.

Physical measurements

Carbon, hydrogen and nitrogen analyses were carried out at Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia. The UV-vis (in DMSO) and IR spectra were recorded using Shimadzu 1600 spectrometer and Perkin Elmer RX1 spectrometer as KBr disks in the range 4000-370 cm⁻¹), respectively.

¹H and ¹³C NMR spectra were carried out on Lambda JEOL 400 MHz FT-NMR spectrometer.

Culture of cells and cytotoxic assay

The technique used was described by Freshney (2000) with some modification. MCF-7 (human breast cancer cells) and SA-2 (human uterus cancer cells) were seeded into 96 well plates at an initial cell density of approximately 5 X 10⁵ cells cm⁻³. After 24 hours incubation for cell attachment and growth, the medium was removed and replaced with fresh medium containing varying concentrations of organic compounds. The compounds added were first dissolved in DMSO at the required concentration. Subsequent 6 desirable concentrations was prepared using growth medium. Control wells received only DMSO. Each concentration of the compound under study was assayed in eight replicates. The assay was terminated after 24 hours incubation period. Again, the medium was removed and the cell viability was determined after further 4 hours incubation with 5 mg cm⁻³ MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] bromide; also named as thiazol blue). DMSO was then added per well and the dissolving formazan precipitate was read by using elisa plate reader, Multiskan Multisoft Primary EIA V. 1.4-0 at 560 nm. For comparison studies, tamoxifen was used as a positive control. IC₅₀ value is taken from the plotted graph of percentage live cells compared to control (%) versus tested concentration of compounds (μg ml⁻¹). The IC₅₀ value is the concentration required for 50% growth inhibition. It represents the growth inhibitory (cytostatic)

effects on cell viability of the compounds tested (Wall *et al.*, 1987).

3. Results and Discussions

IR Spectra

The Zn (II) complexes are light yellow in colour, stable in the air. They are soluble in DMSO, DMF or pyridine. All the complexes melt over 250 °C. The IR spectra of the complexes when compared to that of free ligand show that the ν (N-H) formerly at 3226 cm^{-1} disappears in the spectra of the complexes supporting deprotonation of the ligand upon complex formation. The ν (C=O) bands of 1650 cm^{-1} in the free ligand also disappears in the spectra of the complexes indicating destruction of the keto group presumably *via* enolisation and bonding of the ligand through the resulting enolate oxygen (Hapipah *et al.*, 2004). The ligands also showed strong bands around 1600 cm^{-1} , which are assigned as the ν (C=N) bands. In the metal complexes, this stretching band has shifted to lower frequencies, due to the lowering of the ν (C=N) bond order as a result of zinc-nitrogen bond formation. The shifting of the ν (N-N) from 1030 cm^{-1} to 1082 cm^{-1} wavenumbers further support coordination of the ligand *via* the azomethine nitrogen atom. The ν (C-OH) bands of 1284 cm^{-1} in phenol have disappeared in Zn (II) complexes indicating coordination of OH to the metal center. The new bands at *ca.* 590 and 430 cm^{-1} are tentatively assigned to ν (M-O) and ν (M-N) bands respectively.

NMR Spectra

The ^1H NMR spectra of Zn (II) complexes do not exhibit the NH proton signal lending further support to the infrared evidence that the hydrazide ligand coordinates to the metal center in its deprotonated form. The phenolic δ (OH) peak has disappeared in the ^1H NMR spectra of Zn (II) complex and has shifted to 136 ppm in $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR indicating that zinc atom has bonded to ligand *via* phenolic oxygen.

The $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra show that the (C=O, from 164.57 in ligand to 167.78 ppm in complex) and (C=N, 158.46 to 161.74 ppm) have shifted to higher frequency indicating participation of these groups in chelate formation.

UV-vis of ligands and complexes

The UVvis spectra of the DMSO solution of the ligands recorded between 200-800 nm exhibited strong absorption bands between 267 to 285 nm assignable to $\pi \rightarrow \pi^*$ of the phenyl ring. The bands at 312-334 nm region is attributed to $\pi \rightarrow \pi^*$ transition involving molecular orbital of the azomethine group (C=N). The differences are observed in the visible spectra of the complexes compared to that of the corresponding ligand. The $\pi \rightarrow \pi^*$ transition due to the C=N chromophores has undergone bathchromic shift upon coordination *ca.* 400 nm. The $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the aromatic ring undergoes a shift to higher energy to the lower wavenumbers.

X-ray study

The x-ray structure of one of the zinc (II) complexes, bis $\{\mu\text{-O- [1-(5-chloro-2-oxidophenyl)-ethylidene]-thiophene-2-carbohydrazidato}\}$ bis- [(pyridine)-zinc (II)] or (ZnLCl) was elucidated successfully. The molecule indicates that each zinc atom is coordinated to a tridentate ligand *via* CN, CO and phenolic OH group. The title complex belongs to a monoclinic system with centrosymmetric dimer atoms *via* Zn-O bridge (Hapipah *et al.*, 2004).

Cytotoxicity

The results of cytotoxicity testing are presented in Table 1. According to the United States National Cancer Institute, if the initial cytotoxicity test on cancer cell lines gives IC_{50} value less than 20 μgml^{-1} , this compound can be categorized as having a potential anticancer activity.

Table 1: Cytotoxic activities of ligands and Zn(II) complexes.

Compounds	$\text{IC}_{50} \mu\text{g ml}^{-1}$		
	MCF-7	SA-2	Chang's
TCHHap	4.5	10.5	ac
TCHClHap	18.2	15.0	ac
Zn TCHHap	4.5	9.5	ac
Zn TCHClHap	4.0	9	ac
Tamoxifen	18.2	10.7	wbd

The Schiff base ligand, TCHHap is more sensitive towards the MCF-7 cells (human breast cancer cells) than the chlorinated ligand, TCHClHap with IC_{50} values of 4.5 and 18.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively. However both Zn (II) complexes are very cytotoxic as compared to the well known anticancer drug, tamoxifen. The presence of sulphur atoms in the ligands has enhanced the cytotoxic behaviour as is evident from the lower IC_{50} values of the complexes. This is attributed to an increase in conjugation of the ligand moieties upon complexation as well as the dimer formations of the complexes. Increase in cytotoxic active sites in the dimers might have increased the cytotoxic activity. A similar pattern was shown by SA-2 cell line with TCHClHap and tamoxifen gives a better performance as growth inhibitory compound.

4. Conclusions

The new Zinc (II) complexes have been successfully synthesized from condensation of thiophene-2-carboxylic hydrazides, with either 2-hydroxyacetophenone (LH) or 5-chloro-2-hydroxyacetophenone (LCl) and zinc acetate.

The x-ray structure of one of the zinc (II) complexes, bis $\{\mu\text{-O- [1-(5-chloro-2-oxidophenyl)-ethylidene]-thiophene-2-carbohydrazidato}\}$ bis- [(pyridine)-zinc (II)] or (ZnLCl) was elucidated. The molecule indicates that each zinc atom coordinates to a tridentate ligand *via* CN, CO and phenolic OH group. The title complex belongs to a monoclinic system with centrosymmetric dimer atoms through Zn-O bridges.

The Schiff base, TCHHap is more sensitive towards the MCF-7 cells (human breast cancer cells) and SA-2 cells (human uterus cancer cells) TCHClHap than the chlorinated ligand. However both Zn (II) complexes are very cytotoxic as compared to the well-known anticancer drug, tamoxifen. The presence of sulphur atoms in the ligands, its conjugation upon complexation and polarisability of zinc atoms to the organic moiety has enhanced the cytotoxic behaviour of the compounds.

5. References

1. Swiegers G.F., Malefetse T.J., Chem. Rev., 2000, 100, 3483
2. Vallina A. T., Stoeckli-Evans H., Polyhedron, 2002, 1177-1187.
3. Tarafder M.T.H., Kasbollah A., Crouse K.A., Ali A.M., Yamin B.M., Fun H.K., Polyhedron, 2001, 2363-2370.
4. Haiduc Y., Silvestru A., Coord. Chem. Rev., 1990, 99, 253.
5. Freshney, R.I. 2000. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4 th ed. John Wiley and Sons.
6. Wall, M.E., Taylor, H. & Wani, M. C. R. 1987. Plants antitumor agents, 24. Rapids
7. KB Assay. *J. Nat. Products*, 50 (4): 764-766.
8. Kikuzaki H., Nakatani N., *J. Food Sci.*, 1993, 1407.
9. Hapipah M. Ali, Mazliza Mohammad, M. Sukeri M. Yusof and Bohari M. Yamin, *Acta Cryst.* 2004, E60, 123-125.

Preparation and Structural Features of Tetraethylene Glycol (EO4) and Pentaethylene Glycol (EO5) with Neodymium(III) in the presence of Picrate Anion

Muhammad I. Saleh¹, Eny Kusrini¹, Rohana Adnan¹, Bahruddin Saad¹, Abdussalam Salhin¹, Bohari M. Yamin²

1) School of Chemical Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia
E-mail: midiris@usm.my, eny2kus@yahoo.com, r_adnan@usm.my, salam_salhin@yahoo.com, bahrud@usm.my

2) School of Chemical Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor, Malaysia
E-mail: bohari_bob@yahoo.com

Abstract

The reaction of $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ with acyclic polyethers (tetraethylene glycol, EO4 and pentaethylene glycol, EO5) in the presence of picrate anion produce $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-(\text{H}_2\text{O})$ and $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{EO5})]^+(\text{pic})^-$ complexes. They have been determined by single X-ray diffraction. The crystal system in EO4 complex is triclinic with space group $P\bar{1}$, $a = 8.3472(13)$, $b = 12.597(2)$, $c = 18.837(3)$ Å, $\alpha = 104.740(3)$, $\beta = 96.060(3)$ and $\gamma = 95.009(3)^\circ$, $V = 1891.3(5)$ Å³ and $Z = 2$. The crystal of EO5 complex is monoclinic with space group $P2_1/c$, $a = 18.7757(2)$, $b = 9.03370(10)$, $c = 24.0936(3)$ Å and $\beta = 109.1600(10)^\circ$, $V = 3860.24(8)$ Å³ and $Z = 4$. The glycol ligands all exhibit a helical wrapping pattern around the Nd(III) ions. In EO4 complex, the Nd atom is linked to all the five oxygen atoms of the EO4 ring, one water molecule and two picrate ligands (one via phenoxo oxygen atom and the other one with both phenoxo and nitro oxygen atoms in a bidentate manner). While, in EO5 complex, the Nd atom is coordinated to EO5 ring via all the six oxygen atoms and two picrate ligands is similar pattern with in EO4 complex. The average bond lengths in EO4 complex namely Nd–O(ether) [2.523(3)], Nd–O(phenolic) [2.368(3)], Nd–O(nitro) [2.558(3)] and Nd–OH₂ [2.453(3)] Å. All bond length observed is comparable to the EO5 complex namely Nd–O(ether) [2.540(3)], Nd–O(phenolic) [2.353(3)], Nd–O(nitro) [2.564(3)] Å. The mean deviation from pentadentate plane in EO4 complex [0.7657 Å] is higher than hexadentate in EO5 complex [0.7166 Å]. The (O–C–C–O) torsion angles for EO4 moiety adopts the $g^-g^+g^-g^+$, while that of EO5 moiety adopts a $g^-g^-g^+g^-g^+$ patterns. The geometry of neodymium in the complexes is tricapped trigonal prismatic is stabilized by intermolecular hydrogen bonding of the type C–H...O and O–H...O to form a three dimensional network.

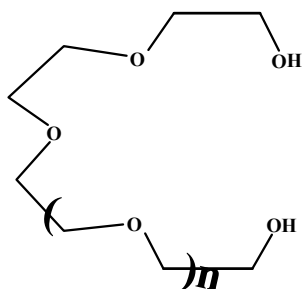
Keywords: Neodymium, Pentaethylene Glycol, Picrate complex, Tetraethylene Glycol

1. Introduction

The presence of the bulky counter anion such as picrate that contained oxygen donor atoms together with ligand having similar donor atoms have produced several solid state complexes with unique coordination behavior. The coordination power of the crown ether depends on the number of donor atoms and the cavity size [Lu *et al.*, 1997]. In our earlier

report [Saleh *et al.*, 2004] on the investigation of the molecular structure and conformation of pentaethylene glycol (EO5) with hydrated praseodymium picrate salts $[\text{Pr}(\text{pic})_2 \cdot \text{EO5}]^+(\text{pic})^-$, interestingly, we discovered the acyclic EO5 formed a crown-like structure, wrapping the Pr(III) with 9-coordinate bonds. In the present study, we report results on the complexation of the same

ligand (EO5) as well as another ligand called tetraethylene glycol (EO4 (Scheme 1) with neodymium picrate in order to observe any significant trends by changing the atomic number of the lanthanide as well the length of the glycol chain.



Scheme 1 if $n = 1 = \text{EO4}$ and $n = 2 = \text{EO5}$

2. Experimental

All chemicals were used without further purification. EO4 (97% purity) was purchased from Acros, USA. Picric acid and EO5 (97% purity) were purchased from Fluka (Germany). Neodymium nitrate hexahydrate $[\text{Nd}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ was purchased from Ward Hill. The preparations of the complexes were carried out as described previously [Saleh *et al.*, 2004].

Direct interaction of $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.434 g, 1 mmol) and picric acid (0.91 g, 3.97 mmol) with EO4 (2.13 g, 11 mmol) in 1 : 1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ produced the dehydrate $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-(\text{H}_2\text{O})$ complex (yield 26%). Microelement analysis, Calc.: C, 29.38, H, 2.35 and N, 11.87%. Found: C, 30.27; H, 2.31 and N, 11.62% with m. p. 200.4°C.

The second complex carried out by the interaction of $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.434 g, 1 mmol) and picric acid (0.91 g, 3.97 mmol) with EO5 (0.6 g, 2.52 mmol) in 3 : 1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ gave the $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{EO5})]^+(\text{pic})^-$ complex (yield 27%). Microelement analysis, Calc.: C, 31.36; H, 2.52 and N, 11.76%. Found: C, 31.66; H, 2.41 and N, 11.52% with m. p. 263.0°C.

Physical measurements

Elemental analyses were carried out using Control Equipment Corporation Model 250-XA, USA. The IR spectra were recorded as KBr pellets, in the range of 4000-400 cm^{-1} on a

Perkin-Elmer 2000 FT-IR spectrometer. ^1H NMR spectra were recorded using Bruker Spectrometer 400 MHz in DMSO solution.

X-ray analysis

The selected crystal was mounted on a glass fiber with epoxy cement for the X-ray crystallographic study. The reflection data was collected with a 1K-SMART CCD diffractometer using graphite-monochromator Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) with a detector distance of 5 cm and swing angle of -35° at 293(2) K. A hemisphere of the reciprocal space was covered by combination of three sets of exposure. Each set had a different θ angle ($0.88; 180^\circ$) and each exposure of 10 sec, covered 0.3° in ω . Crystal decay was monitored by repeating fifty initial frames at the end of data collection and analyzing the intensity of duplicate reflections, and was found to be negligible. The data collected were reduced using the program SAINT [Sheldrick, 1996] and empirical absorption was carried out using SADABS [Sheldrick, 1996]. The structure was solved by direct methods and refined using the full-matrix least square on Fo^2 using the SHELXTL software package [Sheldrick, 1997]. The positions of all remaining non-hydrogen atoms were obtained from successive Fourier syntheses. The position of hydrogen atoms were calculated using idealized geometry.

3. Results and Discussion

Direct reactions of hydrated neodymium nitrate salts with acyclic polyethers and picrate anion produced the complex of 1:1 ratio. The IR spectra revealed that EO4 complex with Nd(III) contained stoichiometric proportions of H_2O as evidenced by the appearance of more broad band of OH groups. The differences in the IR spectra between the free ligand and its complexes are exhibited in Figure 1. The strong absorption bands at 3401 and 2873 cm^{-1} on the EO5 spectrum correspond to the stretching of the alcohol groups (OH) and C-H, respectively. The absorption band corresponding to ν (C-O-C) on the ligand spectra were shifted by 51 and 18 cm^{-1} upon complexation as a clear evidence for the involvement of the oxygen atoms on the ligand framework in the coordination. The free picrate has *vas* (NO_2) and *vs* (NO_2) at 1555 and 1342 cm^{-1} , respectively, which splits into two bands at 1575, 1537 cm^{-1} and 1362, 1332 cm^{-1} for

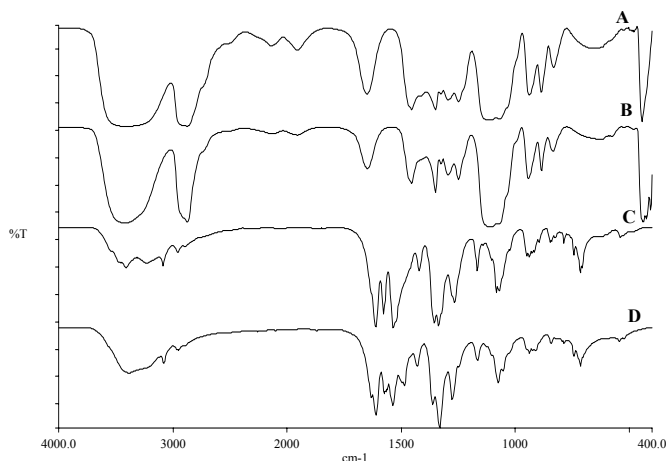


Figure 1. The IR spectra of the EO4 (A) and EO5 (B) ligands and their complexes C: $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{EO5})]^+(\text{pic})^-$ and D: $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-\cdot(\text{H}_2\text{O})$

$[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-\cdot(\text{H}_2\text{O})$ and at 1578, 1535 cm^{-1} and 1355, 1337 cm^{-1} for $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{EO5})]^+(\text{pic})^-$ complexes. This indicates that some of the nitro O atoms were involved in the coordination [Wang *et al.*, 2004].

The ^1H NMR spectra of the free ligands and their complexes are presented here:

EO4 : δ 3.417-3.440 (m, 4H, CH_2^-), 3.471-3.516 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 4.425 (s, 2H, $-\text{OH}$).

EO5: δ 3.400-3.440 (m, 4H, CH_2^-), 3.477-3.509 (m, 16H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 4.142 (s, 2H, $-\text{OH}$).

$[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-\cdot(\text{H}_2\text{O})$: δ 3.417-

3.429 (m, 4H, CH_2^-), 3.467-3.517 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.366 (s, 2H, OH^-), 3.172 (s, 2H, H_2O), 8.591 (s, 6H, pic^-).

$[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{EO5})]^+(\text{pic})^-$: δ 3.399-3.425 (m, 4H, CH_2^-), 3.471-3.511 (m, 16H, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3.333 (s, 2H, OH^-), 8.588 (s, 6H, pic^-).

The data presented showed that EO5 ligand exhibited two multiplets at 3.413 and 3.509 ppm assigned to CH_2^- , $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$, one singlet at 4.142 ppm to $-\text{OH}$. Upon complexation, the proton signal of $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ is shifted to higher field by 0.0008 and 0.002 ppm for EO4 and EO5 complexes, respectively. The proton of the alcohol terminal groups are shifted to lower field by 1.059 ppm (EO4 complex) and 0.809 ppm (EO5 complex).

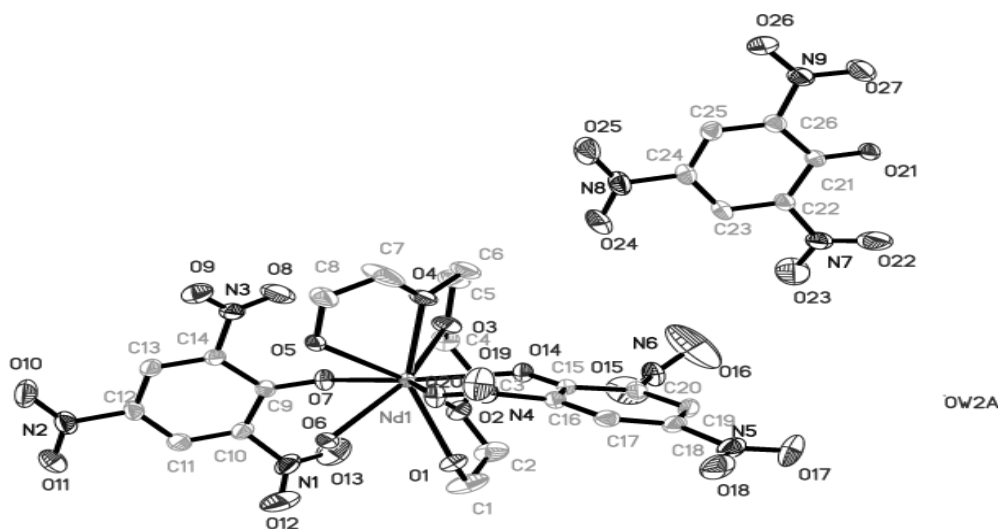


Figure 2 The molecular structure of the $[\text{Nd}(\text{pic})_2(\text{OH}_2)(\text{EO4})]^+(\text{pic})^-\cdot(\text{H}_2\text{O})$ with 30% probability displacement ellipsoid. H atoms are omitted for clarity.

Table 1 The crystal data of the Nd(III) complexes

Parameter	EO4 complex	EO5 complex
Empirical Formula	C ₂₆ H ₂₈ O ₂₈ N ₉ Nd	C ₂₈ H ₂₈ NdN ₉ O ₂₇
Formula weight	1058.81	1066.83
Crystal System	Triclinic	Monoclinic
Space Group	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 8.347(13), <i>b</i> = 12.597(2), <i>c</i> = 18.837(3) Å. α = 104.740(3)°, β = 96.060(3)°, γ = 95.009(3)°	<i>a</i> = 18.7757(2), <i>b</i> = 9.03370(10), <i>c</i> = 24.0936(3) Å β = 109.1600(10)°
Z, Volume (Å ³)	2, 1891.3(5)	4, 3860.24(8)
Calculated Density (μg/m ³)	1.859	1.836
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.491	1.460
F(000)	1062	2140
Crystal size (mm)	0.27 x 0.16 x 0.12	0.20 x 0.13 x 0.15
θ range for data	1.13 - 27.60	1.15 - 30.03
Limiting indices	-10 ≤ <i>h</i> ≤ 10 -16 ≤ <i>k</i> ≤ 16 -24 ≤ <i>l</i> ≤ 24	-26 ≤ <i>h</i> ≤ 26 -12 ≤ <i>k</i> ≤ 12 -33 ≤ <i>l</i> ≤ 33
Reflection collected / Unique	24338 / 8677 [Rint = 0.0244]	20074 / 11254 [Rint = 0.0288]
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data/Restraints/parameters	8677 / 0 / 590	11254 / 0 / 586
Final R index [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0372, wR2 = 0.1002	R1 = 0.0436, wR2 = 0.1226
R indices (All data)	R1 = 0.0390, wR2 = 0.1016	R1 = 0.0743, wR2 = 0.1647
Goodness of fit	1.103	1.074

Crystallography studies

Table 1 summarizes the crystal data of the [Nd(pic)₂(OH₂)(EO4)]⁺(pic)⁻·(H₂O) and [Nd(pic)₂(EO5)]⁺(pic)⁻ complexes. The molecular structure of the EO4 complex is shown in Fig. 2. As shown in the Fig. 2, a

neodymium atom is 9-coordinate by five O atoms from EO4, one from solvated water molecule and two from one bidentate and one monodentate picrates. While, for the EO5 complex, the Nd atom also exhibited a 9-coordination bonds through all the 6 oxygen

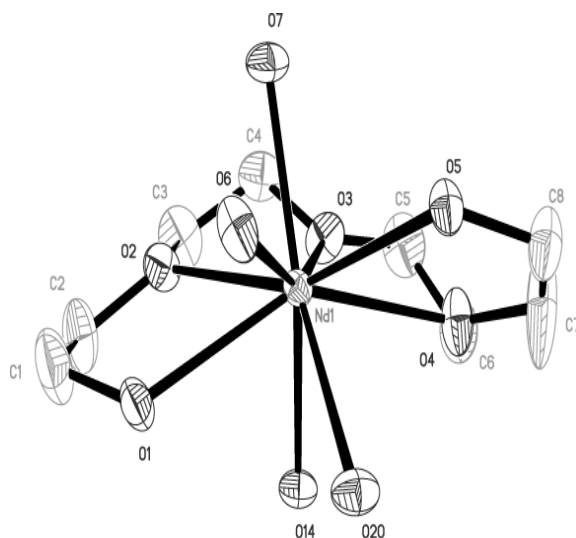


Figure 3 Primary coordination sphere of [Nd(pic)₂(OH₂)(EO4)]⁺(pic)⁻·(H₂O)

atoms and two picrate ligands in a similar pattern as in EO4 complex without the involvement of the solvated water. This atomic arrangement facilitated the tricapped trigonal prismatic geometrical structure. Generally, both the acyclic ligands formed a complex of cyclic-like conformation as depicted in Fig. 3.

The selected bond lengths, bond angles and torsion for the complexes are given in Tables 2 and 3. The average value of bond lengths between the neodymium atom and the coordinated oxygen atoms are [2.485(3)] and [2.501(3)] Å for the EO4 and EO5 complexes, respectively. The Nd atom in EO4 complex is closer to the oxygen donor atoms than EO5 complex because of the different chain length. The average Nd–O(ligand) is 2.620(4) Å in the [Nd(NO₃)₃(EO4)] complex [Lu *et al.*, 1997], which is significantly elongated when compared with the [Nd(pic)₂(OH₂)(EO4)]⁺(pic)⁻(H₂O) complex [mean 2.523 (3) Å]. The five Nd–O(ligand) distances [mean [2.523 (3) Å] are of two types: the two terminal Nd–O(alcohol) distances [mean 2.535(3) Å]

are significantly longer than the three Nd–O(ether) ones [mean 2.515(3) Å]. Comparing with the corresponding in EO5 complex, the Nd–O(ligand) distances [mean 2.540(3) Å] are of two types: the two terminal Nd–O(alcohol) distances [mean 2.518(3) Å] are significantly shorter than the four Nd–O(ether) ones [mean 2.552(3) Å]. The average Nd–O(ligand) is 2.540(3) Å, which is slightly shorter as compared with that in [Nd(NO₃)₂(EO5)](NO₃) [2.563(4) Å] [Rogers *et al.*, 1991].

The angles O–Nd–O for adjacent oxygen atoms of the cyclic ring are a little larger than 60° except for that between the oxygen atoms (O1 and O5 [129.49(10)°] and (O1 and O6 [71.67(10)°] in the terminal alcohol groups. The bigger angles of O1–Nd–O5 in EO4 complex is attributed to the longer distance between the two oxygen atoms compared with those between the other oxygen atoms. The phenyl rings of the coordinated picrates are almost perpendicular and less than 90°. The (O–C–C–O) torsion angles in EO4 ring adopts

Table 2 Selected bond length (Å) and bond angles (°) in the complexes

Atom	EO4 (Å)	EO5 (Å)	Atom	EO4 (°)	EO5 (°)
Nd–O1	2.548(3)	2.541(3)	O1–Nd1–O2	61.87(9)	62.72(9)
Nd–O2	2.562(3)	2.576(3)	O3–Nd1–O2	62.35(10)	60.89(10)
Nd–O3	2.491(3)	2.494(3)	O3–Nd1–O4	62.94(10)	62.68(12)
Nd–O4	2.491(3)	2.565(3)	O4–Nd1–O5	61.72(9)	61.82(13)
Nd–O5	2.522(3)	2.571(3)	O6–Nd1–O5	69.21(10)	62.28(11)
Nd–O6	2.453(3)	2.495(3)	O5–Nd1–O1	129.49(10)	-
Nd–O7	2.334(3)	2.349(3)	O6–Nd1–O1	65.50(10)	71.67(10)
Nd–O14	2.402(2)	2.356(3)			
Nd–O20	2.558(3)	2.564(3)			

Table 3 Selected torsion bond angles (°) in the complexes

Atom	EO4 (°)	EO5 (°)
O1–C1–C2–O2	-40.7(8)	-51.0(6)
O2–C3–C4–O3	48.9(6)	-42.9(6)
O3–C5–C6–O4	-42.7(6)	48.3(8)
O4–C7–C8–O5	1.7(12)	-32.5(14)
O5–C9–C10–O6	-	47.8(7)
C2–O2–C3–C4	-178.3(5)	-83.6(5)
C3–O2–C2–C1	-177.4(5)	-179.9(4)
C4–O3–C5–C6	-170.1(4)	126.1(6)
C5–O3–C4–C3	140.9(5)	-162.4(5)
C7–O4–C6–C5	-125.0(7)	-175.8(6)
C6–O4–C7–C8	155.0(8)	-172.8(8)
C9–O5–C8–C7	-	163.9(9)

the sequence $g^- g^+ g^- g^+$, while that of EO5 ring adopts a $g^- g^- g^+ g^- g^+$. The only (C–O–C–C) torsion angle, which is not anti that is C2–O2–C3–C3 [$-83.6(5)^\circ$] in EO5 chain and it occurs between C–C torsion angles of like sign and deviate toward g^- .

The hydrogen bonding environment of O–H...O and C–H...O to form a three dimensional network in the EO5 complex is much more extensive than in the EO4 complex. Two alcohol oxygen atoms in EO5 chain form H-bonds, while the only one alcohol group in EO4 was used to forms H-bond.

4. Conclusion

The structural results have shown that as the number of donor atom increased in the ligand framework the acyclic polyethers wrap closer around the neodymium ion.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Universiti Sains Malaysia and Universiti Kebangsaan Malaysian for the facilities provided and Malaysian Government financial support through research grants IRPA No. 305/PKIMIA/612906, FRGS No 304/PKIMIA/670006.

6. References

1. Lu T., Ji L., Tan M., Liu Y., Yu, K. (1997). A structural change between the complexes of praseodymium and neodymium nitrates with (Z)-2,3-diphenyl-1,4,7,10,13-pentaoxacyclo-pentadec-2-ene(stilbeno-15-crown-5): synthesis and structures of $[\text{Pr}(\text{NO}_3)_3(\text{stilbeno-15-crown-5})]$ and $[\text{Nd}(\text{NO}_3)_3(\text{EO5})]$ (EO5 = tetraethylene glycol). *Polyhedron* 16, p. 1149-1156.
2. Saleh M. I., Kusrini E., Adnan R., Rahman I. A., Saad B., Usman A., Fun, H.-K., Yamin B.M. (2004). The Crystal Structure and Thermal Stability of [bis-picrate(pentaethylene glycol)] praseodymium(III)picrate Complex. *J. Chem. Crystallogr. In Press, Corrected Proof*.
3. Sheldrick G. M., SAINT V4. (1996). *Software Reference Manual Siemens Analytical X-Rays System*, Madison, WI, USA.
4. Sheldrick, G.M., SADABS. (1996). *Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data*, University of Gottingen; Germany.
5. Sheldrick, G.M., SHELXTL97, Version 5.10. (1997). Bruker AXS, Inc. Madison, WI.
6. Wang Y.-W, Liu W.-S, Tang N, Tan M.-Y. (2004). Studies on ^1H NMR, infrared and fluorescence spectra of rare earth complexes with a new binaphthylamide. *Spectrochimica Acta A*, 60, p. 2459-2463.
7. Rogers R. D., Rollins A. N., Henry R. F., Murdoch J. S., Etzenhouser R. D., Huggins S. E., Nunez L. (1991). Direct comparison of the preparation and structural features of crown ether and polyethylene glycol complexes of $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. *Inorg. Chem.* 30, p. 4946-4954.

Keanekaragaman Molekul dari Tumbuhan Moraceae dan Potensinya sebagai Anti Tumor Serta Pengembangan melalui Kultur Jaringan

Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. J.,
Sjamsul Arifin Achmad, Lukman Makmur dan *Tri Muji Ermayanti

Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia FMIPA,
Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132
*Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor, Km 46, Cibinong

Abstrak

Sejumlah senyawa fenol telah diisolasi dari beberapa spesies Moraceae. Genus *Artocarpus* terutama mengandung jenis flavonoid terprenilasi pada posisi C-3, 6', dan 8'. Prenilasi pada C-3 menghasilkan anekaragam kerangka karbon seperti piran-, furan-, oksepin-, oksosin-, dan jenis dihidrobenzosanton. Dan pola oksigenasi senyawa flavon dari Moraceae sangat unik yakni pada posisi 2',4' atau 2',4',5'. Sedangkan kandungan kimia satu dari 2 spesies Genus *Morus* yang tumbuh di Indonesia yakni *M. macroura* menghasilkan sejumlah senyawa fenol terutama dari jenis stilben, aril benzofuran dan adduct Diels Alder. Disamping itu, sejumlah senyawa non fenol yakni steroid dan triterpen telah diisolasi pula dari kedua genus ini. Beberapa senyawa yang dihasilkan dilaporkan memiliki bioaktivitas yang penting seperti anti-tumor, anti-viral, anti-fungi dan anti-mikroba. Uji sitotoksik yang dilakukan terhadap sel murin leukemia P 388 dari beberapa senyawa yang diisolasi seperti artoindonesianin, artokarpin, mulberofuran-K, caplasin, dan morasin-M menunjukkan aktivitas yang sangat tinggi dengan IC_{50} berturut-turut 0,2; 1,9; 1,9; 2,0; dan 2,4 $\mu\text{g/mL}$. Mengingat potensinya yang sangat tinggi spesies ini dikembangkan melalui kultur jaringan sebagai produsen metabolit sekunder. Pada makalah ini akan dibahas mengenai metabolit sekunder yang diisolasi dari kultur tunas, kultur akar dan pengaruh penambahan elisitor.

1. Pendahuluan

Moraceae merupakan famili tumbuhan yang besar terdiri dari 60 genus dan 1400 spesies dan penyebarannya meliputi daerah tropis dan subtropis Asia. Berbagai spesies dari famili ini telah dimanfaatkan sejak lama untuk memenuhi berbagai keperluan termasuk sandang, pangan dan obat tradisional. Daun *Morus alba* yang dikenal dengan murbei telah lama dikenal sebagai pakan ulat sutera, dan bagian kulit akarnya digunakan sebagai obat asma. Beberapa spesies *Artocarpus* seperti *Artocarpus heterofilus* (nangka), *A. champeden* (cempedak) dan *A. communis* (sukun) menghasilkan buah yang sangat digemari untuk dikonsumsi, sedangkan akar *A. integer* digunakan untuk obat malaria, dan getah *Antiaris toxicaria* (upas) di zaman primitif

digunakan sebagai racun panah yang mematikan. Dari 60 genus yang termasuk famili Moraceae, *Morus* dan *Artocarpus* termasuk genus yang telah banyak dikaji kandungan kimia dan aktifitas biologinya. [Heyne, 1987; Jaret, 1959; Jaret, 1960]

Genus *Artocarpus* terdiri dari sekitar 50 spesies, tersebar mulai Sri Lanka, India, Pakistan dan Indo China melalui kepulauan Malesia, dan populasi tertinggi terdapat di Indonesia, Malaysia dan Filipina. Sedangkan *Morus* termasuk genus yang kecil terdiri dari 15 spesies, tumbuh di daerah beriklim sedang dan subtropis, beberapa diantaranya ditemukan di China dan Jepang. Dari segi kimia tumbuhan Moraceae dilaporkan sangat kaya dengan senyawa fenol terprenilasi, termasuk

flavonoid, arilbenzofuran dan aduct Diels-Alder. Beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas farmakologis seperti antihipertensi, antimikroba dan promoter anti-tumor. [Nomura, 1988; Nomura, 1994]

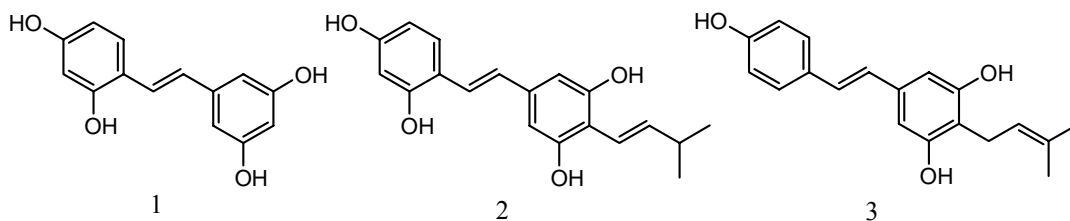
Dalam makalah ini akan dibahas mengenai pola kimia beberapa spesies genus *Artocarpus* dan *Morus* yang tumbuh di Indonesia, serta hubungan struktur beberapa senyawa yang dihasilkan dengan sitotoksitasnya terhadap sel murin leukemia P 388. Disamping itu akan

dikaji pula metabolit sekunder yang dihasilkan melalui kultur jaringan.

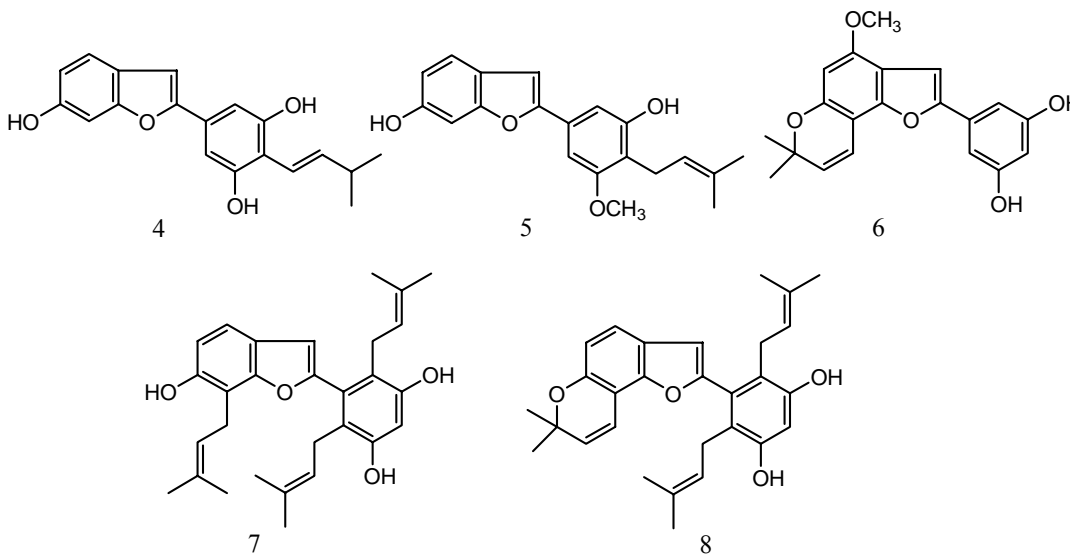
Senyawa fenolik dari genus *Artocarpus*

Sekitar dua puluh spesies *Artocarpus* yang tumbuh di Indonesia telah diselidiki kandungan kimianya di laboratorium kami. Metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari genus ini meliputi senyawa fenolik terprenilasi dari jenis stilben, arilbenzofuran dan flavonoid disamping senyawa nonfenol steroid dan triterpen.

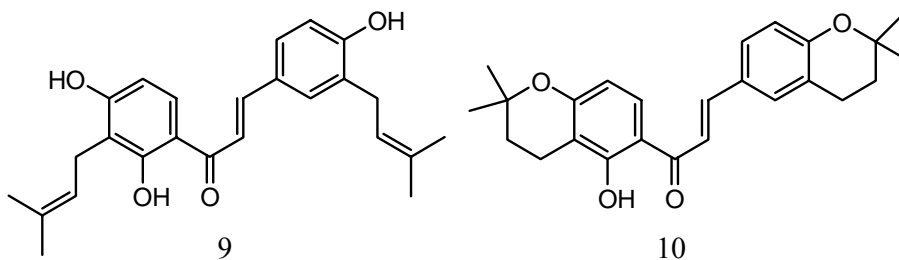
Oksiresveratrol (1) merupakan senyawa stilben



Gambar.1. Stilben dari *Artocarpus*



Gambar.2. Turunan 2-Arilbenzofuran dari *Artocarpus*



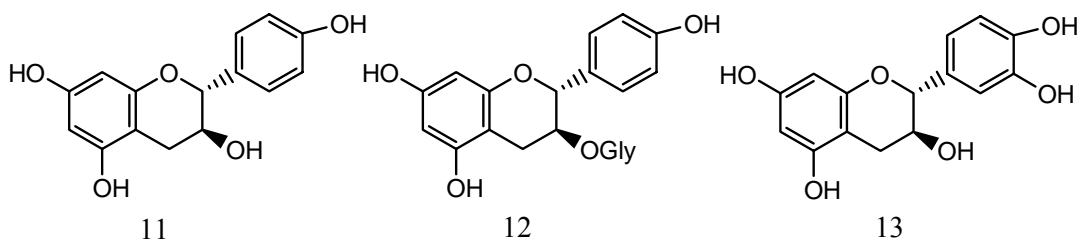
Gambar.3. Calkon dari *Artocarpus*

yang paling sederhana dari genus ini, yang diisolasi dari *Artocarpus dasyphyllus* dan *A. gomezianus*, sedangkan dua stilben terprenilasi yakni artoindonesianin-F & N (2) & (3) ditemukan berturut-turut dari *A. altilis* dan *A. gomezianus*.

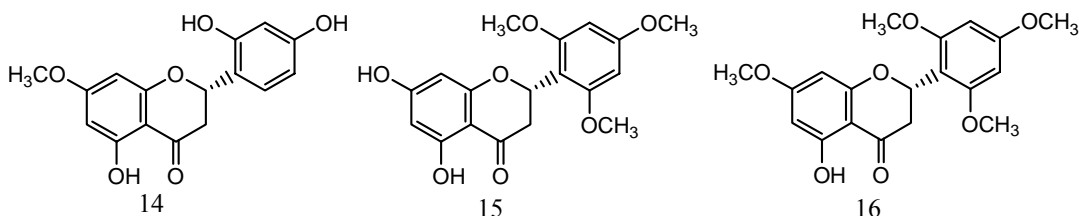
Senyawa turunan 2-arilbenzofuran sangat jarang ditemukan pada genus *Artocarpus*, sejauh ini hanya artotonkin yang dilaporkan diisolasi dari *A. tonkinensis*. Namun sejumlah senyawa baru dari jenis arilbenzofuran terprenilasi telah diisolasi dari beberapa spesies *Artocarpus* Indonesia yang kami selidiki, yakni artoindonesianin-AN (4) dari *A. altilis*, artoindonesianin-AR (5) dari *A. gomezianus*, artoindonesianin-AJ (6) dari *A. champeden* dan

dari *A. fretessi* telah diisolasi artoindonesianin-Y (7) dan artoindonesianin-X (8). [(Soekanto, 2003)]

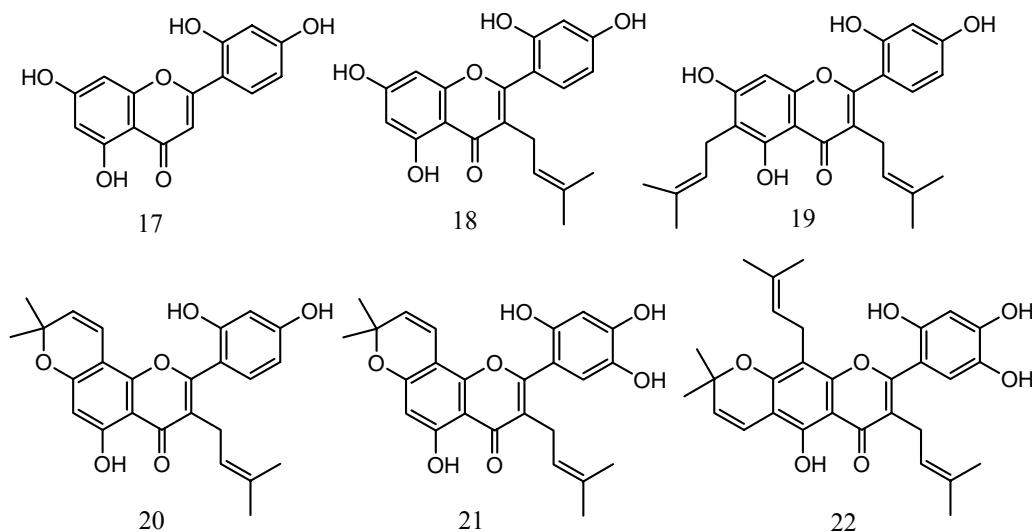
Berbeda dengan 2-arilbenzofuran, senyawa calkon terprenilasi banyak dilaporkan terdapat pada genus *Artocarpus*. Tiga senyawa dihidrocalkon terprenilasi dilaporkan diisolasi dari *A. communis*, dan tujuh calkon terprenilasi yakni paratokarpus A-G diperoleh dari *A. venenosa*. Sedangkan dari hampir dua puluh spesies *Artocarpus* yang diselidiki di laboratorium kami, hanya *A. bracteata* Hook yang mengandung senyawa jenis calkon terprenilasi yakni konzanol-C (9) dan artoindonesianin-J (10). Spesies ini dikenal dengan nama daerah cubadak hutan,



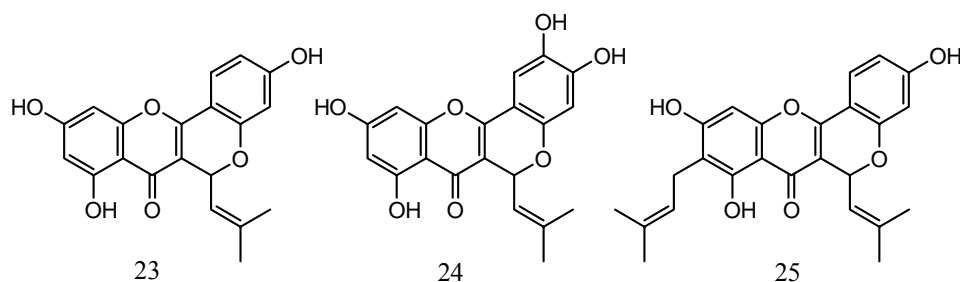
Gambar.4. Flavan-3-ol dari *Artocarpus*



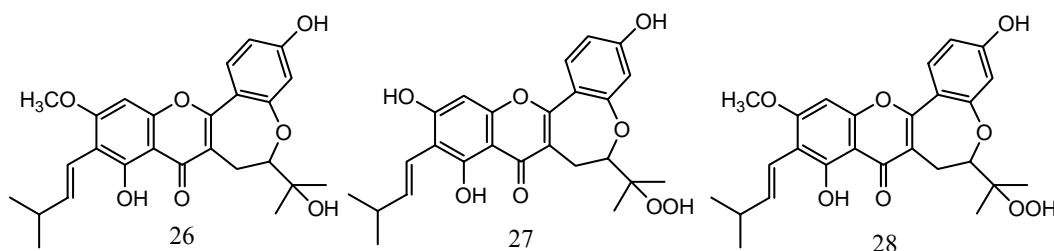
Gambar.5. Flavanon dari *Artocarpus*



Gambar.6. Flavon dari *Artocarpus*



Gambar.7. Piranoflavanon dari *Artocarpus*



Gambar 8. Oksepinoflavon dari *Artocarpus*

merupakan spesies yang endemik untuk Sumatera Barat.[Ersam, 2002]

Senyawa turunan flavan yakni flavan-3-ol, flavanon dan flavanonol banyak ditemukan pada *Artocarpus*. Demikian juga yang diselidiki di laboratorium kami, tiga senyawa flavan-3-ol yakni afzelecin (11) diisolasi dari *A. reticulatus* dan *A. dasyphyllus*, afzelecin-3-ramnosida (12) selain ditemukan pada dua spesies tersebut terdapat pula pada *A. dadah*, dan katecin (13) diisolasi dari *A. reticulatus*.

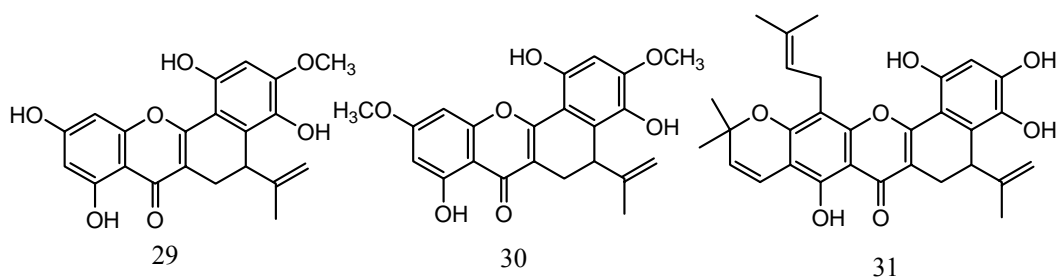
Tiga senyawa turunan flavanon yakni artokarpanon (14), artoindonesianin-E (15) dan heteroflavanon-A (16) telah diisolasi dari *A. champeden*. Spesies ini termasuk *Artocarpus* yang endemik untuk Indonesia, terdapat di pulau Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Maluku sampai Irian Jaya, di Jawa Barat dikenal dengan nama cempedak. Tumbuhan ini termasuk tumbuhan obat yang cukup populer, untuk digunakan sebagai obat malaria. [(Hakim, 2001)]

Senyawa turunan flavon merupakan komponen yang dominan dalam genus *Artocarpus*. Puluhan flavon terprenilasi telah dilaporkan di literatur dengan ciri struktur yang sangat karakteristik, yakni pola oksigenasi cincin B pada 2',4' atau 2',4', dan 5'. Sedangkan prenilasi terjadi pada posisi C-3, C-6, atau C-8. Norartokarpetin (17) merupakan flavon yang

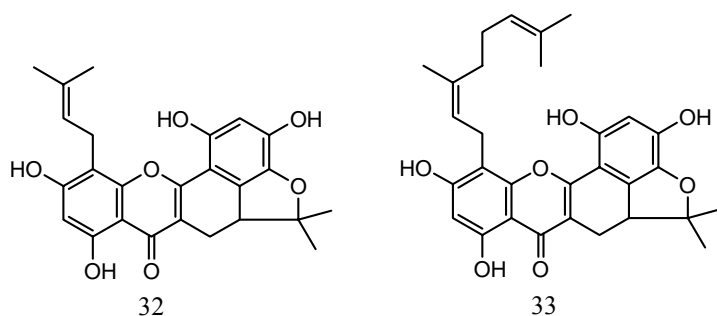
paling sederhana yang merupakan precursor untuk senyawa turunan flavon terprenilasi, senyawa ini ditemukan pada banyak spesies *Artocarpus* yakni *A. champeden*, *A. dasyphyllus*, *A. gomezianus*, dan *A. kemando*. Dari *A. champeden* juga ditemukan siklokomunol (18) flavon tersubstitusi dengan satu isoprenil pada posisi C-3, kudraflavon (19) flavon dengan dua isoprenil masing-masing pada C-3 dan C-6, dan heterofilin (22) flavon tersubstitusi tiga isoprenil berturut-turut pada C-3, C-6 dan C-8. Selanjutnya dari *A. altilis* diisolasi morusin (20) dan artonin-E (21) masing-masing dengan dua isoprenil. [Kurniadewi, 2001]

Substituen isoprenil pada posisi C-3 menyebabkan terjadinya diversifikasi kerangka karbon melalui siklisasi gugus tersebut dengan gugus hidroksil pada posisi C-2' menghasilkan piranoflavon seperti terlihat pada tiga senyawa yang diisolasi dari *A. champeden*, yakni albanin-A (23), artoindonesianin (24) dan siklokomunin (25).; Oksepinoflavon ditunjukkan oleh senyawa chaplalin (26), artoindonesianin-K (27) dan artoindonesianin-B (28), ketiga senyawa ini diisolasi dari *A. champeden*. [Achmad, 1996; Hakim, 1999]

Siklisasi gugus isoprenil pada C-3 dengan dengan C-6' menghasilkan kerangka dihidrobenzosanton seperti terlihat pada tiga



Gambar 9. Dihydrobenzosanton dari *Artocarpus*



Gambar 10. Furanodihydrobenzosanton dari *Artocarpus*

senyawa yang diperoleh dari *A. champeden*, artoindonesianin-T (29), artoindonesianin-S (30) dan artonin-B (31). [Syah, 2002]

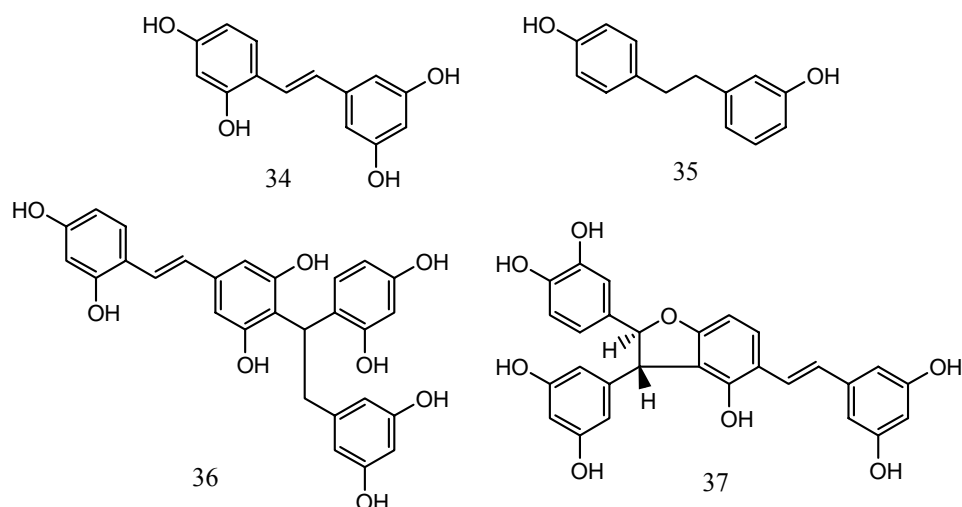
Dan dua senyawa lain artonin-A (32) dan artoindonesianin-A (33) yang diisolasi dari spesies yang sama memiliki kerangka furanodihydrobenzosanton, sebagai hasil siklisasi C-10 pada isoprenil di C-3 dengan C-6' pada cincin B dilanjutkan dengan siklisasi C-11 dengan O pada C5'. [Hakim, 2000].

Senyawa fenolik dari genus *Morus*

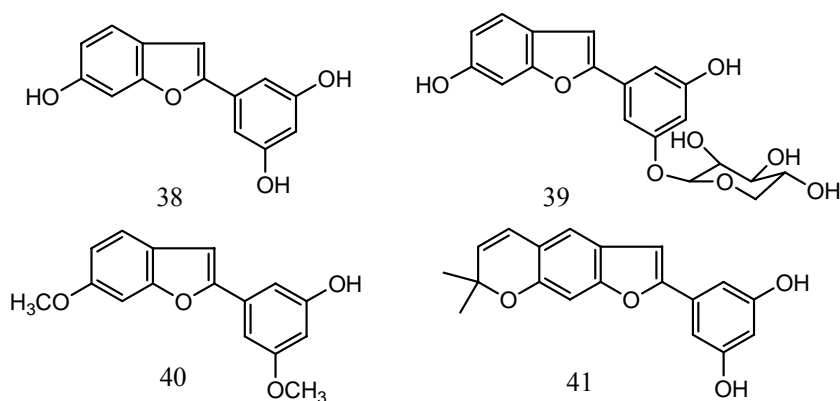
Dari 15 spesies yang termasuk genus *Morus*, 9

spesies diantaranya telah diselidiki kandungan kimianya terutama berasal dari Jepang dan China. Senyawa kimia yang dilaporkan dari penelitian terhadap genus ini terutama senyawa fenol dari jenis 2-arilbenzofuran dan aduct Diels-Alder disamping kumarin, stilben, flavonoid dan santon.

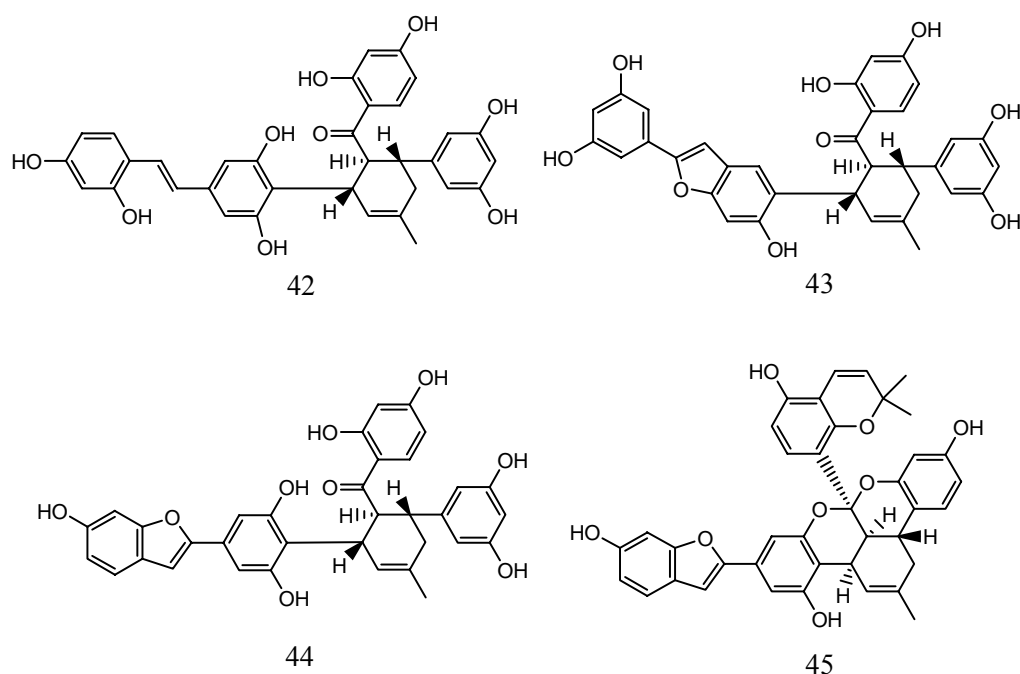
Dua spesies *Morus* tercatat tumbuh di Indonesia yakni *Morus alba* dan *M. macroura*. *M. alba* sejak lama dikenal diberbagai negara sebagai pakan ulat sutera dan digunakan dalam



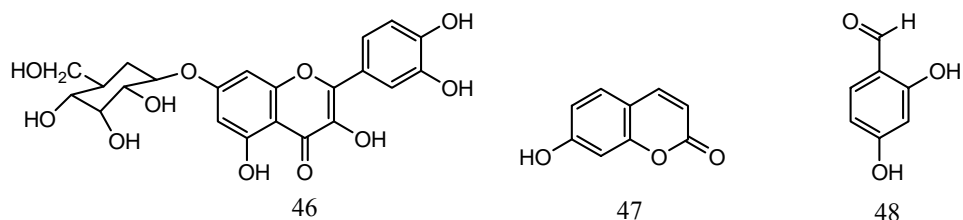
Gambar 11. Stilben dari *Morus macroura*



Gambar 12. 2-Arilbenzofuran dari *Morus macrourea*



Gambar 13. Aduct Diels Alder dari *Morus macrourea*



Gambar 14. Senyawa fenol lain dari *Morus macrourea*

pengobatan tradisional, dan penyelidikan kimia terhadap spesies ini telah banyak dilakukan. Sedangkan *M. macrourea* merupakan spesies

endemik Indonesia dan hanya terdapat di Sumatra Barat dan Jawa Barat yang dewasa ini populasinya sudah sangat langka. Penyelidikan

kimia terhadap spesies *M. macroura* telah dilakukan di laboratorium kami selama beberapa tahun ini. Senyawa fenol yang berhasil diisolasi terutama dari jenis stilben yakni oksiresveratrol (34) dan dihidrostilben, lunularin (35). Dua senyawa baru dimer stilben yakni andalasin-A (36) dan andalasin-B (37) telah ditemukan pula dari spesies ini.[Syah, 2000]

Selanjutnya empat senyawa turunan 2-arilbenzofuran telah diisolasi pula dari spesies ini, yakni morasin-M (38) dan glikosidanya mulberosida-C (39), morasin-B dan morasin-P suatu senyawa turunan 2-arilbenzofuran yang terpenilasi [Makmur, 1996; Soekanto, 2000]

Empat senyawa aduct Diels-Alder yang berhasil diisolasi dari spesies *M. macroura* adalah kuwanon-X (42), albaforan-C (43), mulberofuran-J (44) dan mulberofuran-K (45). Kuwanon-X merupakan aduct antara isoprenil stilben sebagai diena dengan calcon sebagai dienofil, sedangkan tiga senyawa terakhir

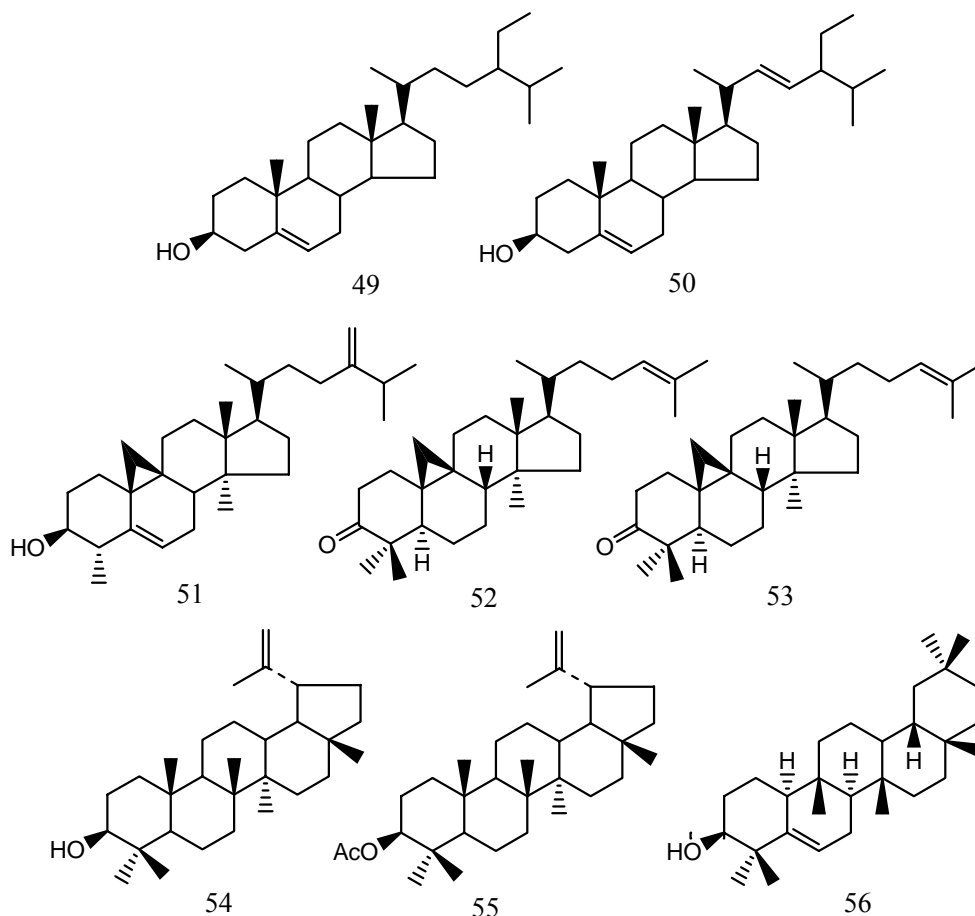
merupakan aduct antara isoprenil arilbenzofuran sebagai diena dengan calcon sebagai dienofil.

Senyawa fenol lain yang juga ditemukan dalam spesies *M. macroura* adalah, turunan flavon, 7- β -glukosida-3,5,3',5'-tetrahidroksiflavon (46), umbeliferon (47) suatu turunan kumarin dan β -resorsilaldehid (48).[Soekanto, 2000b]

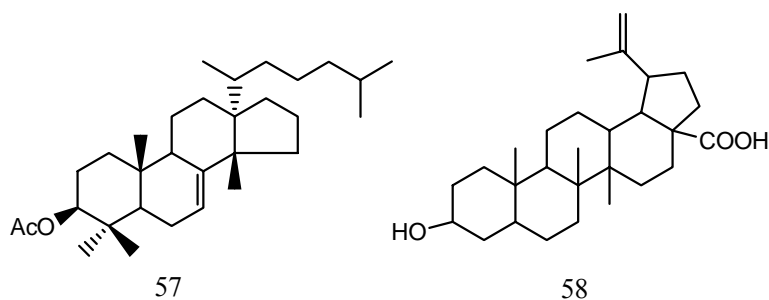
Senyawa nonfenol dari Moeaceae

Senyawa non fenol yang diisolasi dari spesies Moraceae, baik genus *Artocarpus* maupun *Morus* terutama dari jenis steroid dan triterpenoid.

Dari genus *Artocarpus* telah diisolasi dua steroid yang lazim terdapat dalam tumbuhan yakni β -sitosterol (49) yang ditemukan pada *A. altilis*, *A. bracteata*, *A. champeden* dan *A. dadah*, dan stigmasterol (50) yang diisolasi dari *A. bracteata* dan *A. reticulatus*. Disamping itu enam triterpenoid, tiga diantaranya dengan kerangka tetrasiklik yakni sikloeukalenol (51), sikloartenon (52) dan 24-



.Gambar 15. Steroid dan triterpen dari *Artocarpus*



Gambar 16. Steroid dan triterpen dari *Morus macrourea*

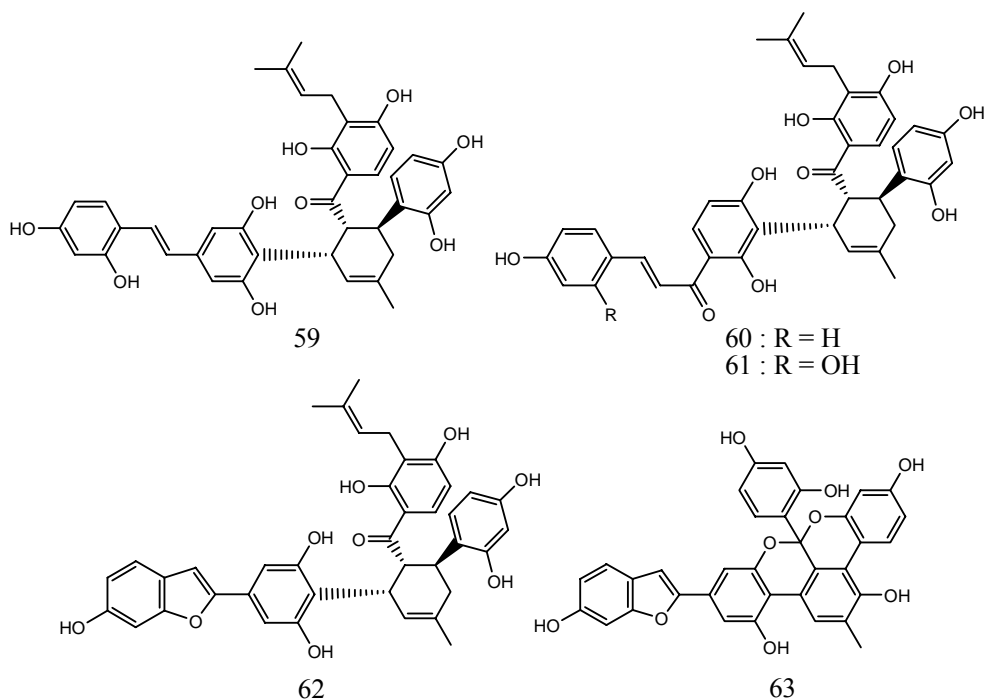
metilensikloartenon (53) diisolasi dari *A. champeden*, dan tiga triterpenoid lainnya dengan kerangka pentasiklik yakni lupeol (54) ditemukan pada *A. dadah*, lupeol asetat (55) dari *A. altilis*, *A. bracteata* dan *A. reticulatus*, dan glutinol (56) diperoleh dari *A. champeden*.

Dari spesies *Morus macrourea* telah diisolasi steroid β -sitosterol (49) dan empat triterpen tetrasiklik yakni sikloekalenol (51), sikloartenon (52), 24-metilensikloartenon dan butirospermil asetat (57). Dan dua triterpen pentasiklik yaitu glutinol (56) dan asam betulinat (58), senyawa yang disebut terakhir dilaporkan memiliki aktifitas anti HIV. [Nomura, 1998]

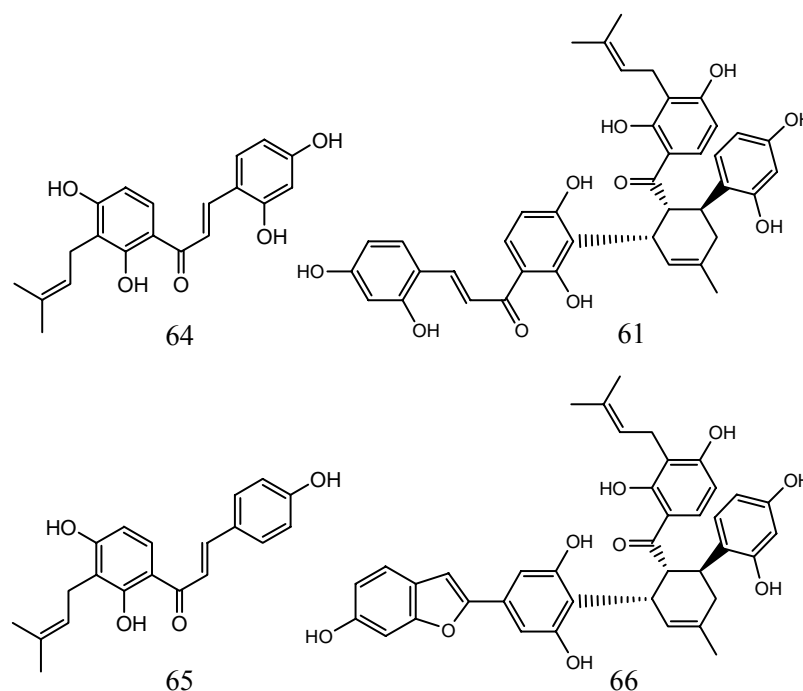
Pengembangan kultur jaringan

Kultur jaringan tumbuhan telah dikenal sejak tahun 50 an, pada awalnya dilakukan terutama untuk keperluan mikropropagasi tanaman pertanian dan hortikultur. Pada tahun 70 an mulai dilaporkan metabolit sekunder dalam kultur jaringan tumbuhan, dan berkembang kearah manipulasi cell /jaringan untuk melipatgandakan metabolit sekunder melebihi kadarnya dalam tumbuhan alami. (Bantorpe, 1994). Dewasa ini teknik kultur jaringan banyak dikembangkan di negara Jerman dan Jepang.

Dari kultur akar *M. macrourea* dalam media MS + 1 μ Mol IBA, diperoleh lima senyawa aduct Diel-Alder yakni kuwanon-E (59) hasil sikloadisi antara dehidroprenilstilben sebagai



Gambar 17. Aduct Diels Alder dari kultur akar *Morus macrourea*



Gambar 18. Senyawa fenolik dari kultur tunas *Morus macroura*

diana dengan dienofil isoprenilcalkon, kuwanon-R (60) dan kuwanon-J (61) aduct antara dehidroprenil calkon dengan isoprenilcalkon, calkomorasin (62) dan mulberofuran-P (63) aduct antara dehidroprenil-2-arilbenzofuran dengan calkon.

Penambahan elicitor abiotik Fe^{3+} terhadap kultur akar ternyata meningkatkan kuantitas kuwanon-J, senyawa ini merupakan aduct antara dua molekul moracalkon-A dimana moracalkon-A merupakan precursor dienofil untuk hampir semua aduct yang dihasilkan dari kultur jaringan.

Dari kultur tunas spesies yang sama dalam media MS + 2,5 μ mol benziladenin (BA) diperoleh dua calkon terprenilasi yakni moracalkon-A (64) yang merupakan precursor dienofil untuk hampir semua aduct Diels-Alder yang diisolasi dari kultuir jaringan *M. macroura*, dan isobavacalkon (65) merupakan precursor diena untuk senyawa kuwanon-R (60). Disamping itu ditemukan pula dua aduct Diels-Alder kuwanon-J (61) dan calkomorasin (66).

Sangat menarik, sejauh ini kalau dibandingkan senyawa fenol yang diisolasi dari kedua genus *Artocarpus* dan *Morus*, masing-masing

memiliki pola kimia yang berbeda. Dimana Genus *Artocarpus* terutam mengandung stilben, 2-arilbenzofuran dan flavon yang umumnya terprenilasi kecuali flavanon. Dan adanya isoprenil pada C-3 menyebabkan diversifikasi kerangka karbon membentuk pirano-,oksepino-, oksosinoplavon serta dihidrobenzosanton dan furano dihidrobenzosanton. Sedangkan senyawa fenol dari *Morus macroura* terutama stilben dan 2-arilbenzofuran yang tidak terprenilasi dan senyawa lainnya adalah aduct Diels-Alder dengan calkon tdk terprenilasi sebagai dienofil.

Kalau diperhatikan senyawa fenol yang diisolasi dari tumbuhan inang *M. macroura* baik stilben maupun 2-arilbenzofuran umumnya tidak terprenilasi, demikian halnya calkon sebagai dienofilnya untuk aduct Diels-Alder yang dihasilkan juga tidak terprenilasi. Sedangkan metabolit sekunder dari kultur akar maupun kultur tunas terutama aduct Diels-alder dengan calkon terprenilasi sebagai doenofil. Selanjutnya pada tumbuhan inang *M. macroura* tidak ditemukan calkon, sedangkan dari kultur tunas ditemukan calkon yang merupakan precursor dari aduct yang diperoleh. Disamping itu dengan ditemukannya isobavacalkon disamping moracalkon-A maka

Tabel 1 . Sitotoksitas senyawa fenol dari Moraceae terhadap sel P388

Senyawa	Jenis	IC ₅₀ (µg/mL)
Oksiresveratrol (1)	Stilben	8
Artoindonesianin F (2)	Stilben terprenilasi	1.6
Morasin-M (38)	2-arilbenzofuran	2.4
Artokarpanon (14)	flavanon	19.3
Artokarpin	3-prenilflavon-2',4'- teroksigenasi	1.9
Artoindonesianin (24)	piranoflavon	0.2
Sikloartokarpin	piranoflavon	3.9
Caplasin (26)	oksepinoflavon	2.0
Artoindonesianin (28)	oksepinoflavon	3.9
Artoindonesianin-A (33)	Furanodihidrobenzosanton	21.0
Mulberofuran-K (45)	Diels-Alder	1.9

masih terbuka kemungkinannya ditemukannya adduct lain sebagai hasil sikloadisi isobavacalkon dengan stilben dan 2-arilbenzofuran seperti halnya dengan moracalkon-A.

Aktivitas Biologi

Beberapa spesies tumbuhan Moraceae sejak lama digunakan sebagai obat tradisional diberai negara selain di Indonesia seperti China dan Jepang (Nomura, 1988).

Sejumlah senyawa fenol yang diisolasi dari Moraceae telah diuji sitotoksinya terhadap sel murin leukemia P388 sebagai uji primer untuk aktivitas antitumor. Dan beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas yang tinggi, seperti terlihat pada Tabel 1.

Kajian mengenai hubungan antara struktur dengan aktivitas dapat dinyatakan sbb. Adanya isoprenil pada turunan stilben meningkatkan sitotoksitas, demikian juga pada turunan 2-arilbenzofuran dan flavon yang terprenilasi pada C-3 menunjukkan aktivitas tinggi ,tapi tidak untuk yang membentuk furanosanton dan flavanon.

Ucapan Terima kasih

Kepada berbagai pihak yakni: Kementerian Pendidikan Nasional, Kementerian Riset dan Teknologi, Center Grant, Que Project, dan Asahi Glass yang telah mendanai penelitian ini diucapkan terima kasih. Penulis juga ingin berterima kasih atas kerjasama Prof. Norio Aimi dan staff, Chiba University, Japan, dan Prof. Emilio Ghisalberti, University of Western Australia dan Prof, Koichi Takeya dari Tokyo University of Pharmacy & Life Science,

Tokyo, Japan. Tak lupa terima kasih juga disampaikan kepada Herbarium Bogoriensis untuk bantuannya mengidentifikasi tumbuhan sampel, dan terakhir kepada Prof. Ikram dan Staff Jabatan Kimia, UKM yang dua tahun terakhir ini banyak membantu dalam pengukuran spektrum NMR.

Daftar Pustaka

- Acmad, S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin, D., Juliawaty, L.D., and Syah, Y.M., Discovery of natural products from indonesian tropical rainforest plant: Chemodiversity of Artocarpus (Moraceae). Bilge Sener (Eds), Biodiversity: Biomoleculer Aspect of Biodiversity and Utilization. Kluwer Academic/Plenum Publisher, London, 2002, 91-99
- Acmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Makmur, and Suyatno, Anew prenlylated flevone from Artocarpus chempeden, J. Nat. Prod., 59 (1996), 878-879
- D.V. Banthorpe, Secondary Metabolism in Plant Tissue Culture: Scope and Limitations, Natural Product Reports, 1994, 303-328
- Daigo, K., Inamori, Y., Tekemoto, Studies on Constituen of the Water Extract of the Root of Mulberry Tree (*Morus bombycis* Koidz Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 2243-2246
- Ersam, T., S.A. Achmad, E.L. Ghisalberti, E.H. Hakim, L. Makmur, Y. M. Syah, " A new Isoprenylated Chalcone, Artoindonesianin J, from the Root and Tree Bark of *Artocarpus bracteata*", J. Chem. Res. (S), 186-187 (2002)
- Fukai, T., Hano, Y., Hirakura, K., Nomura, T., Uzawa, J., Structur of Mulberrofuran H, a Novel 2-Arylbenzofuran Derivative from the Cultivated Mulberry Tree (*Morus Ihou* (Ser.) Koidz), Chem. Pharm. Bull., 1984, 32(2) 808-811

**Euis Holisotan Hakim, Yana Maolana Syah, Lia Dewi Juliawaty,
Sjamsul Arifin Achmad, Lukman Makmur dan *Tri Muji Ermayanti**

- Hakim, E.H. Aripin, A., Achmad, S.A., Aimi, N., Kitajuma, M., Makmur, L., Mujahidin, D., Syah, Y.M. and Takayama, H., Artoindonesianin E, A new flavanone derivatives from *Artocarpus champeden*, Proceedings ITB, 2001, 69-73
- Hakim, E.H. Eliza, Kusumawati, Y., Achmad, S.A., Makmur, L., Aimi, N., Takayama, H. and Kitajima, M., Some phenolic compound from genus *Artocarpus*, J. Mat. Sci., 34 (1999) 199-205
- Hakim, E.H., Fahriyati, A., Achmad, S.A., Makmur, L., Mujahidin, D., Nomura, T. and Syah, Y.M., Artonin A, A Furanodihydrobenzoxanthone derivatives from from *Artocarpus champeden*, J. Kimia Andalas (2000) 72-76
- Hakim, E.H., Fahriyati, A., Kau, M.S., Achmad, S.A., Makmur, L., Ghisalberti, E.L. and Nomura, T., Artoindonesianin A and B, two new prenylated flavones from the root bark of *Artocarpus champeden*, J.Nat. Prod., 62 (1999) 613-615
- Hakim, E.H., Makmur, L., Achmad, s.a., Aimi, N., Ghisalbert, E.L., Kitajima, M., Mujahidin, D., Syah, Y.M. and Takayama, H., Rcent studies on biologically active natural producta from *Artocarpus* species of Indonesian rainforest, In Atta-ur Rahaman, M.I., Choudhary and K.M. Khan (Eds), Natural Products chemistry at the Turn of the Century, Prints, Karachi, 2002, 331-338
- Hakim, E.H., Marlina, E.V., Mujahidin, D., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., and Makmur, L., *Artocarpin* and Heteroflavanon A, Two new bioactive flavonoids from *Artocarpus champeden*, Proceedings ITB, 1988, 31-36
- Hano, Y., Miyagawa, Y., Yano, M., Nomura, T., Structures of Mulberofuran P and S, Two Novel 2-Arylbenzofuran Derivatives from the Cultivated Mulberry Tree, Heterocycles, 1989, 28(2), 745-750
- Heyne, K., The Useful Indonesian Plants, Research and Development Agency, The Ministry of Forest Forestry, Jakarta, Indonesia 1987
- Jarett, F.M., Studies in *Artocarpus* and allied genera, III. A revision of *Artocarpus* subgenus *Artocarpus*, J. Arnold Arbo. (1959) 1-298
- Jarett, F.M., Studies in *Artocarpus* and allied genera, IV. A revision of *Artocarpus* subgenus *Pseudojaca*, J. Arnold Arbo. (1960) 73-320
- Kurniadewi, F., Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, L., Mujahidin, D., Syah, Y.M., Oxyresveratrol and Norartocarpetin from *Artocarpus gomezianus* Wall, Proceedings National Seminar on Natural Product Chemistry, Jakarta, Indonesia, 2001, 467-470
- Lemmens, R.H.M.J., Soerianegara, I. And Wong, W.C. (Eds), Palnt Resources of South-East Asia, No. 5(2). Timber trees: Minor Commercial Timbers, Prosea Foundation, Bogor, Indonesia, 1955, 57-71
- Nomura, T., Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants, Fortschr. Chem. Org. Narurst., 64 (1988) 87-201
- Soekanto, N.H., Achmad, S.A., Hakim, E.H., Syah, Y.M., Aimi, N., Kitajima, M., Takayama, H., Umbeliferon Senyawa antifungal dari Tumbuhan Andalas *Morus macrouara*, Bull.Soc. Nat. Prod. Chem., Indonesia, 2000, 13-19
- Soekamto, N.S., S.A., Achmad, E.L. Ghisalberti, E.H. Hakim, Y.M. Syah (2003). Artoindonesianin X dan Y, two new isoprenylated 2-arylbenzofurans from *Artocarpus fretessi* Hassk. (Moraceae), *Phytochemistry*. 64, p 831-834
- Syah, Y.M., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., and Mujahidin, D., Two new cytotoxic isoprenylated flavones, Artoindonesianin U and V, from the heartwood of *Artocarpus champeden* Spreng (Moraceae), *Fitoterapia* 75 (2004) 134-140
- Syah, Y.M., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Iman, M.Z.N., Makmur, L., Mujahidin, D., Andalasin A. A New Stilbene Dimer from *Morus macrouara*, *Fitoterapi*, 2000, 71, 630-635
- Syah, Y.M., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Makmur, L. Mujahidin, D., Artoindonesianin Q-T four new isoprenylated flavones from *Artocarpus champeden* Spreng. (Moraceae), *Phytochemistry*, 61 (2002) 049-953
- Syah, Y.M., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Makmur, L. Mujahidin, D., Artoindonesianin M, A new isoprenylated flavone from *Artocarpus champeden*, Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia) 2002, 31-36

Senyawa Antifertilitas Diterpenoid Alkaloid dari Daun Senggugu (*Clerodendron serratum* L.Moon) terhadap Tikus Putih (*Rattus novvergicus*) Jantan Secara *in vitro*

Euis Julaeha¹⁾, Supriyatna²⁾, Unang Supratman¹⁾, dan Anas Subarnas²⁾

¹⁾Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jatinangor 45643, Sumedang.

²⁾Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jatinangor 45643, Sumedang.

Abstrak

Suatu senyawa kelompok diterpenoid alkaloid telah diisolasi dari fraksi etil asetat daun *Clerodendron serratum* (*Verbenaceae*). Struktur senyawa aktif ditentukan berdasarkan data fisika dan spektroskopi UV, IR, ¹H, dan ¹³C-NMR. Uji aktivitas dari isolat dilakukan secara *in vitro* pada konsentrasi 0,25 µg/µL terhadap spermatozoa tikus putih (*Rattus novvergicus*). Senyawa dapat menurunkan motilitas dan viabilitas, dan menaikkan abnormalitas spermatozoa.

Kata kunci : *senggugu*, *Clerodendron serratum*, *antifertilitas*, *tikus putih*, *Rattus novvergicus*, *diterpenoid alkaloid*.

1. Pendahuluan

Clerodendron serratum merupakan salah satu tumbuhan obat dari famili *Verbenaceae*. Aktivitas biologi yang telah diketahui dari tumbuhan ini adalah sebagai antihistamin⁽¹⁾; saponin yang diisolasi dari *C. serratum* mempunyai efek pada sel-sel mesenterium tikus⁽²⁾; ekstrak bagaian akarnya mempunyai efek antinosisseptif, antiinflamasi, dan antipiretik⁽³⁾; ekstrak etanol bagian daunnya mempunyai efek antifertilitas terhadap hewan pengerat⁽⁴⁾; dan alkaloid dari akar *C. serratum* sebagai antiasmatik⁽⁵⁾.

Senyawa yang telah diketahui terkandung pada tumbuhan *C. serratum* adalah D-manitol⁽⁶⁾, flavonoid (lutiolin, lutiolin 7-O-β-D-glukosida, skutellarein), fenolat (katekin), steroid (α-spinasterol, stigmasterol, sitosterol), triterpenoid (asam kueretenoat, asam seratagenoat), dan alkaloid^(7,8,9).

Struktur senyawa antinosisseptif dan antifertilitas dari *C. serratum* ini belum diketahui. Oleh karena itu, dalam makalah ini akan dilaporkan hasil isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas dari daun *C. serratum*. Struktur molekul ditetapkan

berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H, dan ¹³C-NMR. Pengujian antifertilitas dilakukan secara *in vitro* terhadap spermatozoa tikus putih jantan pada konsentrasi 0,25 µg/µL.

2. Percobaan

Umum. Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat ukur titik leleh mikro Fisher-John. Spektrum UV dan IR masing-masing diukur dengan UV varian Conc. 100 dan FTIR Spectrum One Perkin Elmer. Spektrum ¹H dan ¹³C-NMR ditentukan dengan Spektrometer JEOL JNM A-400 (standar TMS dengan pelarut kloroform). Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom ditekan pada adsorben wakogel, silika gel G60, ODS, dan kromatografi cair kinerja tinggi preparatif dengan alat Hitachi L600, detector Hitachi L-4000, UV-detector. Kromatografi lapis tipis menggunakan plat KLT silika gel GF254. Analisis spermatozoa dengan menggunakan Hemositometer Improved Neubaur dan mikroskop.

Bahan Tumbuhan. Bahan tumbuhan berupa daun *C. serratum* yang dikumpulkan pada bulan April 2003 di daerah Sumedang, Jawa Barat. Tumbuhan diidentifikasi di

Laboratorium Herbarium, Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung, Bandung.

Hewan Percobaan. Tikus putih (*R. novergicus*) diperoleh dari Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang.

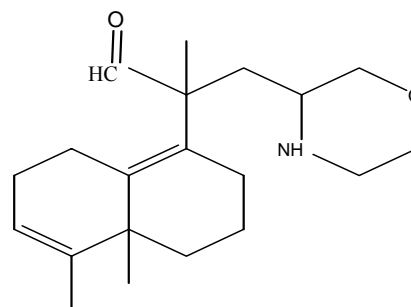
Uji Aktivitas. Sampel diujikan pada konsentrasi 0,25 µg/µL terhadap spermatozoa tikus putih secara *in vitro*. Spermatozoa dikumpulkan dari kauda epididimis. Suspensi spermatozoa disiapkan dalam 10 tetes NaCl 0,9% kemudian diencerkan 1000 kali dalam NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dicampurkan dengan sampel pada konsentrasi 0,25 µg/µL kemudian dianalisis motilitas, viabilitas, dan abnormalitas dengan menggunakan hemositometer improved Neubauer dan mikroskop. Kontrol dianalisis dengan cara yang sama tanpa sampel.

Ekstraksi dan Isolasi. Daun *C. serratum* yang telah dikeringkan (600 gram) dimaserasi dengan metanol. Ekstrak metanol dikumpulkan kemudian diuapkan pada tekanan rendah diperoleh residu sebanyak 100 gram. Residu kemudian dilarutkan dalam air dan dipartisi dengan n-heksana. Fraksi n-heksana dipisahkan dan fraksi air dipartisi kembali dengan etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dikumpulkan dan dipekatkan, diperoleh residu berwarna coklat (5 gram). Fraksi etil asetat dipisahkan dengan kromatografi kolom ditekan menggunakan adsorben wakogel, pelarut heksana : etil asetat : MeOH secara bertahap dengan kenaikan 10% polaritas dimulai dari heksana 100%, terkumpul 17 fraksi. Fraksi ke-11 (K, 146,4 mg) dipisahkan kembali dengan adsorben yang sama dan pelarut heksana : etil asetat (3:2), terkumpul 12 fraksi. Fraksi ke-5 (K5, 31,8 mg) dipisahkan dengan adsorben ODS dan pelarut MeOH : H₂O (9:1) terkumpul 4 fraksi. Selanjutnya fraksi ke-2 (K52, 21,7 mg) dipisahkan dengan kromatografi cair kinerja tinggi preparatif menggunakan kolom inertsil ODS dengan pelarut MeOH : H₂O (7:3), terkumpul 3 fraksi. Puncak ke-3 (K523, dengan tr 14,58 menit, 18,5 mg) dipisahkan kembali dengan kromatografi kolom ditekan pada adsorben silika gel G60 menggunakan pelarut heksana : etil asetat (55:45), terkumpul 5 fraksi. Isolat K5234 (7,6 mg) diperoleh berbentuk kristal amorf tidak berwarna.

Isolat K5234. Isolat diperoleh sebagai kristal tak berwarna, t.l 120-122°C. UV (CHCl₃), λ_{maks} (log ε) : 240 nm. IR (KBr) V_{maks} : 3416 (N-H), 1701 (C=O), 1295 (C-O-C), 1906 (C-N). ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm : 1,02 (3H, s), 1,05 (3H, s), 1,34 (4H, m), 1,71 (3H, s), 2,02 (4H, m), 2,35 (4H, m), 2,85 (1H, dd; dd; dd; 4,6; 5,4 ;6,1 Hz), 3,50 (1H, d, 10,4 Hz), 3,75 (1H, d, 10,9 Hz), 4,17 ; 4,20 (2H, d, 6,8 Hz), 5,4 (1H, dd; dd; dd, 1,2; 1,2; 1,2 Hz), 7,27 (1H, s), 10,06 (1H, s). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ ppm : 16,5 ; 18,0 ; 18,4 ; 20,6 ; 24,7 ; 25,0 ; 26,7 ; 35,1 ; 35,5 ; 38,8 ; 40,9 ; 43,1 ; 51,7 ; 59,2 ; 65,3 ; 24,3 ; 131,9 ; 138,1 ; 166,8 ; 193,0.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolat K5234 diperoleh sebagai kristal amorf tidak berwarna dengan titik leleh 118-120°C. Spektrum UV dalam metanol memberikan serapan maksimum pada 240 nm. Dari spektrum UV diindikasikan adanya kromofor etilenik. Spektrum IR menunjukkan adanya gugus fungsi N-H, ikatan rangkap C=C, C=O, C-H alifatik, dan C-N. Spektrum ¹³C-NMR memberikan 20 sinyal karbon dan menunjukkan adanya karbon aldehid pada 193,0 ppm. Dari spektrum DEPT pada 135°C menunjukkan adanya 3 gugus metil (CH₃), 9 gugus metilen (CH₂), 2 metin (CH), dan diperoleh 5 karbon kuartener. Pada spektrum ¹H-NMR menunjukkan adanya 3 gugus metil yang beresonansi pada 1,02 ppm (3H, s), 1,05 ppm (3H, s), dan 1,71 (3H, s). Adanya gugus N-H ditunjukkan pada 7,2 ppm (1H, s) diperkuat dengan adanya sinyal pada 2,85 dari CH₂ yang terikat pada N-H (CH₂-NH) dan pada 3,50 dari CH yang terikat pada N-H (CH-NH). Dari data-data yang terhimpun maka isolat K5234 diduga merupakan suatu diterpenoid alkaloid dengan dugaan struktur sebagai berikut:



Tabel 1. Hasil uji antifertilitas ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan isolat K5234 terhadap spermatozoa *R. norvegicus*

Sampel	% Rata-rata		
	Penurunan motilitas	Penurunan viabilitas	Kenaikan abnormalitas
Ekstrak metanol	37,70	34,00	8,45
F. Etil asetat	18,81	15,00	14,45
Isolat K5234	15,56	55,67	5,33

Hasil uji aktivitas pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan isolat K5234 tertera pada Tabel 1.

Hasil perhitungan secara statistik menggunakan uji t-student dan diikuti uji Newman-Keuls membuktikan bahwa baik ekstrak metanol, fraksi etil asetat maupun isolat dapat menurunkan motilitas dan viabilitas, dan menaikkan abnormalitas spermatozoa tikus putih secara berarti.

4. Kesimpulan

Dari fraksi etil asetat daun *C. serratum* telah ditemukan suatu senyawa golongan diterpenoid alkaloid. Senyawa tersebut menurunkan kualitas spermatozoa tikus putih. Pengukuran NMR 2 dimensi masih sedang dilakukan untuk mempertajam dugaan struktur senyawa.

5. Ucapan Terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Tomoyuki Fujita dan Dr. Kohki Akiyama di Laboratory of Natural Products Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-85312, Japan untuk pengukuran spektra NMR. Terima kasih disampaikan pula kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, atas bantuan dana Hibah Bersaing XII.

6. Daftar Pustaka

1. Sachdev, K.C., Vasavada, S. A., and Joseph, A. D. (1964). *Indian Journal of Pharmacy*. 26 (4). 105-106.

2. Gupta, S. S., Bhagwat, A. W., and Modh, P. R., (1971). Effect of *Clerodendron serratum* Saponin on The Mast of Rat Mesentery. *Indian Journal Medicinal Science*. 25 (1). 29-91.
3. Viswanathan, S., Vijayasekaran, V., and Sukumar, E. (1998). Antinociceptive, Antiinflammatory and Antipyretic Effects of Ethanol Extract of *Clerodendron serratum* Roots in Experimental Animals. *Journal of ethnopharmacology*. 65 (3). 237-241.
4. Connolly J.D., Faulkner D.J., Mori K., Nakanishi K., Gurrison G., Raphael R.A., Shamma M., and Tamm Ch. 1994. *Dictionary of Natural Product*. Vol 9. Type of Compound Index. Chapman & Hall. London.
5. Gupta S.S. 1977. Prospects and Perspectives of Natural Product in Medicine. *Indian Journal of Pharmacology*. 26.
6. Grage, V. P., and Verma, S. C. (1967). Chemicals Examination of *Clerodendron serratum*. Isolation and Characterization of D-mannitol. *Journal of Pharmacology science*. 56 (5). 639-640.
7. Dalimartha S. 2002. *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta : Trubus Agriwidya. 133-135.
8. Grainge M. and Ahmed S. 1988. *Handbook of plant with pest-control properties*. New York. John Wiley and Sons. 85.

Isolasi Dan Uji Kemampuan Lipolitik Bakteri Isolat Bak Biologis Pabrik Penyamakan Kulit

Evi Susanti⁽¹⁾, Fariati⁽²⁾, Utami Sri Hastuti⁽³⁾

1-2) Jurusan Kimia-FMIPA-Universitas Negeri Malang (UM)
Jl. Surabaya 6 Malang-East Java-Indonesia

3) Jurusan Biologi- FMIPA-Universitas Negeri Malang (UM)
Jl. Surabaya 6 Malang-East Java-Indonesia

Abstrak

Sistem biologis (campuran bakteri fakultatif) pada tahap akhir pengolahan limbah penyamakan kulit kurang efektif digunakan pada limbah yang memiliki kadar lemak tinggi yaitu setelah proses peminyakan (fat liquoring) pada pengolahan kulit lunak. Akibatnya terjadinya peningkatan kadar lemak pada bak pengolahan, sehingga kadar H₂S, BOD, COD, dan pH meningkat dan menyebabkan kematian bakteri. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan menambahkan bakteri lipolitik yang potensial ke dalam sistem tersebut. Bakteri lipolitik potensial dapat diisolasi dari bakteri alam yang ada pada bak biologis. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri dan menguji kemampuan lipolitik isolat bak biologis pabrik penyamaan kulit. Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Kimia UM Malang. Isolasi bakteri dilakukan pada media NA, uji kemampuan lipolitik dilakukan pada media selektif dan limbah yang telah disteril. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 15 isolat yang berhasil diisolasi dari bak biologis, hanya 8 isolat yang memiliki kemampuan lipolitik potensial. Kemampuan lipolitik isolat bak biologis pada media selektif lebih tinggi dibandingkan dengan isolat konsentrat. Beberapa isolat menunjukkan kemampuan lipolitik yang signifikan pada limbah steril yang mengandung lemak tinggi. Pemakaian 2,5% isolat 13 dan 5% isolat 11 dengan waktu inkubasi selama 8 jam pada suhu kamar mampu menurunkan kadar lemak hingga 37%.

Kata kunci: bakteri, lipolitik, isolasi, penyamakan kulit

1. Pendahuluan

Pengolahan limbah pabrik penyamakan kulit telah dilakukan dengan cukup baik menggunakan beberapa tahap pengolahan. Tahap terakhir dilakukan dengan sistem biologis yaitu menggunakan campuran dari berbagai macam bakteri, baik bakteri aerob juga bakteri anaerob (bakteri anaerob fakultatif). Campuran bakteri ini dapat menguraikan lemak, pati, protein, dan selulosa. Campuran bakteri tersebut selain berfungsi menekan pertumbuhan bakteri berbau busuk (bakteri alam) yang terdapat pada limbah, juga mampu menguraikan senyawa-senyawa yang menimbulkan bau seperti NH₃ dan senyawa sulfida (H₂S), sehingga bau busuk pada limbah

akan berkurang.

Sistem biologis (campuran bakteri fakultatif) pada tahap akhir pengolahan limbah penyamakan kulit kurang efektif digunakan pada limbah yang memiliki kadar lemak tinggi yaitu setelah proses peminyakan (*fat liquoring*) pada pengolahan kulit lunak. Akibatnya terjadinya peningkatan kadar lemak pada bak pengolahan, sehingga kadar H₂S, BOD, COD, dan pH meningkat dan menyebabkan kematian bakteri. Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan menambahkan bakteri lipolitik yang potensial ke dalam sistem tersebut.

Bak biologis merupakan sumber bakteri alamiah yang sangat melimpah. Pada umumnya

isolat alamiah memiliki kemampuan adaptasi yang baik, maka diduga isolat bak biologis memiliki kemampuan lipolitik yang lebih baik dari pada isolat konsentrat yang sebelumnya telah digunakan. Sasaran dari penelitian ini adalah mengisolasi dan menguji kemampuan lipolitik bakteri dari bak biologis.

2. Percobaan

2.1. Isolasi Bakteri Pengurai Lemak

Sebanyak 1 mL hasil pengenceran larutan yang berasal dari bak biologis diinokulasi ke dalam media padat NA, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni pada masing-masing cawan petri dihitung. Koloni tunggal digoreskan pada medium NA miring dalam tabung dan diinkubasi selama 24 jam, sehingga diperoleh biakan murni. Sebagai pembanding dilakukan pula isolasi bakteri dari konsentrat bakteri.

2.2. Uji Kemampuan Lipolitik Isolat Bakteri (Metoda Goresan)

Isolat bakteri biakan murni diinokulasi dalam media selektif yaitu medium NA+10% lemak (olive oil) yang diberi neutral red, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri yang dapat menghidrolisis lemak akan menyebabkan penurunan pH medium, sehingga terbentuk warna merah pada bagian bawah koloni bakteri dan terbentuk daerah jernih di sekitar koloni. Jika tidak terjadi hidrolisis lemak, maka pH dalam medium tetap, yaitu pada pH mendekati pH netral sehingga koloni bakteri akan berwarna kuning.

2.3. Uji Kemampuan Lipolitik Isolat Bakteri (Metoda Sumuran)

Pada media selektif (medium NA+10% lemak (olive oil) yang diberi neutral red) dibuat satu lubang berdiameter 0,5 mm. Isolat bakteri biakan murni pada media NC (Nutrien Cair) diinokulasi dalam lubang yang telah dibuat dengan menggunakan *syiring*. Isolat bakteri yang dapat menghidrolisis lemak akan menyebabkan penurunan pH medium, sehingga terbentuk warna merah pada bagian bawah koloni bakteri dan terbentuk daerah jernih disekitar koloni. Jika tidak terjadi hidrolisis lemak maka medium tetap dalam pH mendekati netral dan bagian bawah koloni bakteri berwarna kuning.

2.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Lipolitik.

Isolat bakteri potensial menghidrolisis lemak diinokulasi dalam 150 mL medium nutrisi Broth cair. Perhitungan secara langsung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm setiap 2 jam, dan dihentikan jika pertumbuhan bakteri telah mencapai fase logaritmik akhir dan jumlah bakteri pada tiap-tiap jenis bakteri kurang lebih sama. Bakteri yang telah mencapai fase logaritmik dijadikan sebagai starter.

2.5. Uji Coba Kemampuan lipolitik Pada Limbah

Larutan starter dimasukkan dalam 100 mL limbah cair yang mengandung lemak, diinkubasi pada suhu kamar sambil diagitasi 150 rpm selama 8 jam. Larutan starter yang digunakan divariasi 0 mL (kontrol negatif), 5, 10, 15, mL.

2.6. Penentuan Kadar Lemak (Metode Gravimetri).

Sampel yang mengandung lemak diasamkan dengan H₂SO₄ 1:1 hingga pH 2, dialirkan ke dalam corong pemisah, diekstraksi dengan 30 ml heksana dan dikocok-kocok selama 2 menit sampai terbentuk 2 lapisan. Kemudian lapisan air dikeluarkan, sedangkan lapisan organik ditampung melalui corong yang dialasi kertas saring dan Na₂SO₄ anhidrat ke dalam labu takar bulat yang telah diketahui beratnya. Apabila lapisan organik membentuk emulsi kurang lebih 5 ml, maka harus disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2400 rpm. Endapan diekstraksi kembali, sedangkan filtrat diperlakukan disaring lagi dengan Na₂SO₄ anhidrat. Lapisan organik dalam labu takar bulat diuapkan pada suhu 85 C dan dengan menggunakan adaptor, menampung pelarut dalam erlenmeyer yang terdapat dalam *icebath*. Apabila kondensasi telah berhenti, pindahkan labu dasar bulat dari waterbath. Dinginkan ke dalam desikator selama 30 menit kemudian ditimbang. Kadar lemak diperoleh sebagai berikut:

$$\text{mg lemak dan minyak/ liter} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{ml sampel}}$$

Keterangan: A = berat labu + lemak

B = berat labu

3. Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan ciri-ciri fisiologis dan morfologis telah berhasil diperoleh 16 biakan murni dari bak biologis dan 15 biakan murni dari konsentrat bakteri. Uji kemampuan lipolitik pada media selektif dengan metode goresan menunjukkan 15 isolat bak biologis dan 11 isolat konsentrat bakteri memiliki kemampuan lipolitik, tetapi tidak dapat ditentukan intensitasnya dengan baik. Uji kemampuan lipolitik pada media selektif dengan metode sumuran menunjukkan 8 isolat bak biologis memiliki kemampuan lipolitik yang cukup baik, sedangkan isolat dari konsentrat bakteri yang memiliki kemampuan lipolitik yang sama baiknya hanya 4 isolat. Data selengkapnya dinyatakan pada Tabel 1-3. Hasil tersebut menyarankan bahwa isolat bak biologis memiliki kemampuan lipolitik yang lebih baik dari pada isolat konsentrat bakteri yang digunakan sebagai pembanding.

Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan pada isolat 13B menunjukkan bahwa awal fase log terjadi setelah jam ke-3 dan akhir fase log setelah jam ke-25 dengan nilai OD_{600nm} antara 0,155 hingga 1,08. Data selengkapnya ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan hal tersebut maka pembuatan starter untuk penelitian selanjutnya dilakukan dengan menumbuhkan biakan murni selama 24 jam hingga dicapai $OD_{600nm} \sim 1$.

Uji kemampuan lipolitik pada limbah steril yang mengandung kadar lemak tinggi menunjukkan bahwa biakan murni dari isolat bak biologis yang berbeda (11B dan 13B) memiliki kemampuan yang berbeda untuk menguraikan lemak yang terdapat dalam limbah, dimana isolat 13B kemampuan lipolitiknya lebih tinggi dibandingkan isolat 11B.

4. Kesimpulan

1. Biakan murni yang berhasil diisolasi dari bak biologis pengolahan limbah pabrik penyamakan kulit sebanyak 16 isolat.
2. Uji kemampuan lipolitik pada media selektif menunjukkan 8 isolat bak biologis yang memiliki kemampuan lipolitik yang baik.
3. Uji kemampuan lipolitik pada limbah menunjukkan isolat 11B dan 13B

mampu menurunkan kadar lemak hingga 37% .

5. Ucapan terima kasih

1. Kementerian Riset Teknologi (KRT)-Proyek Riset Unggulan Kemitraan.
2. PT Nasional Djawa Kulit (NDK) Singosari-Malang-Jawa Timur-Indonesia
3. Lembaga Penelitian Uniersitas Negeri Malang (UM)

6. Daftar Pustaka

1. Lenore S. Clesceri; Arnold E. Greenberg and Andrew D. Eaton. (1998). *Standard Methods for The Examination f Water and Wastewater*. 20th Ed. Baltimore, United Book Press.
2. Ronald M. Atlas (1984). *Microbiology: fundamentals and application*. New York: Macmillan.
3. Sari, D.K. 2002. *Karakteriterisasi Bakteri Lipolitik yang Diisolasi dari Limbah Cair Tapioka*. Malang: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Isolasi Bakteri dari Bak Biologis

Ciri	Koloni Bakteri Berasal Dari Limbah Cair Penyamakan Kulit Sisa Hasil Proses Fat Liquoring (Bak Biologis)															
	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	14B	15B	16B
Warna Koloni	Putih jernih	Kuning mentega	Krem kekuningan	Krem	Jernih	Kuning	Krem	Putih jernih	Putih krem	Kuning	Putih	Kuning mentega	Putih	Kuning	Putih	Kuning
Bentuk Koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat tak beraturan	Bulat	Bulat tidak beraturan	Bulat tidak beraturan	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Seperti tasbih	Bulat	Bulat tak beraturan	Bulat	Bulat
Tepi Koloni	Licin	Licin	Licin	Berombak	Licin	Berombak	Berombak	Licin	Berombak	Licin	Bergelombang	Licin	Licin	Bergelombang	Licin	Licin
Elevasi Koloni	Timbul	Seperti Tetesan	Rata	Rata	Timbul	Timbul	Rata	Rata	Timbul	Rata	Timbul	Seperti tetesan	Timbul	Rata	Rata	Timbul
Respirasi	a.o.	a.f.	a.f.	a.f.	a.o.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.
Jumlah koloni total pada semua tingkat pengenceran	TBUD	TBUD	28	3	2	8	TBUD	19	75	1	5	8	33	29	42	10
Kemampuan lipolitik	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Keterangan: a.f. = anaerob fakultatif, a.o. = anaerob obligatif, TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Tabel 2. Hasil Identifikasi Isolasi Bakteri dari Konsetrat Bakteri (Pembanding)

Ciri	Koloni Bakteri Berasal Dari Konsentrat Bakteri														
	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A	12A	13A	14A	15A
Warna Koloni	Putih	Putih	Putih	Putih transparan	Putih bening transparan lebih tipis	Kuning keju	Kuning transparan	Orange transparan	Hijau	Kuning mentega	Kuning keju	Kuning keju	Putih	Orange Kemera han	Kuning seperti mentega
Bentuk Koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bundar dengan tepian kerang	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Tidak beraturan	Bulat	Bulat
Tepi Koloni	Licin	Licin	Licin	Licin	Berombak	Licin	Berombak	Berombak	Berombak	Berlekuk-lekuk	Berombak	Berlekuk-lekuk	Berlekuk - lekuk	Licin	Licin
Elevasi Koloni	Seperti tetesan	Seperti Tetesan	Seperti tetesan	Timbul	Datar	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung	Seperti tetesan	Seperti tetesan	Cembung	Timbul	Seperti tetesan	Seperti tetesan
Respirasi	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.	a.f.
Jumlah koloni total pada semua tingkat pengenceran	361	35	133	TBUD		TBUD	90	TBUD	TBUD	29	1	44	2	7	15
Kemampuan lipolitik	++	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: a.f. = anaerob fakultatif, a.o. = anaerob obligatif, TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Tabel 3. Uji kemampuan lipolitik dengan metode sumuran

Konsentrat Bakteri		Bak Biologis	
No. Koloni	Zona jernih	No. Koloni	Zona Jernih
1A	+	5B	++
2A	++	7B	++
5A	-	8B	++
11A	+	9B	+
12A	-	10B	++
14A	-	11B	++
15A	++	13B	++
		16B	++

Tabel 4. Uji Kemampuan Lipolitik Pada Limbah

Nomer Isolat	Konsentrasi lemak (ppm)				
	Tanpa Penambahan	Penambahan 2,5 mL	Penambahan 5 mL	Penambahan 10 mL	Penambahan 15 mL
11B	102,93	60,24	42,48	44,12	56,79
13B	109,23	40,98	49,85	81,41	83,27

Build Layered Structure Of Polyalkylthiophene (Pat-6)/Polyquinoline (PQ) films By Spin Coating-Method

F.A. Asmuruf ¹⁾, R. SATO ²⁾, N. ASANO ²⁾, N. TAN ²⁾, K. ORIHARA ²⁾

1) Jurusan Kimia, Universitas Cenderawasih
Kampus Baru Waena, Jayapura, 99358, Indoensia
e-mail: asmuruf@yahoo.com/

2) Department of Science and Engineering, Graduate School,
Yamagata University, Japan

Abstract

Many different polymers have been shown to emit light under the application of an electric field (electroluminescence, EL). Polyphenylvinylene and its derivatives are still the most commonly used materials, but polythiophenes, polypyridines are now being used ¹⁾. The extent application of Polymer based layered structure from cellular phone, flat panel display, loan battery, organic transistor, printer pull circuit, etc, have been considering and investigating to develop light emitting polymer device. Our research efforts in the area of polymer opt-electronic devices focuses on build layered structure. Continuously electronic luminance and display colors of electronic device are depend on layered structure of built device. PolyAlkylThiophene-6 and polyquinoline are conducting polymers with highly π -conjugated main chain. It have attached much interest as optoelectronic materials, because of their high performance and advantages in fabrication of large area thin films by spin-coating method in the individual use. The basic structure of polymer electronic device (PED) are comprise of glass substrate, ITO anode, polymer layers and cathode (Al or Ca) ²⁾. Based on the basic structure of PED, we propose the following structure which comprise of glass substrate, ITO anode, PAT-6/PQ films as a polymer layers, Al cathode. The 0,5% polymer solution was made by dissolving PAT-6 and PQ into chloroform. The polymer solution was dropped on the surface of glasses and spun for 20 second to get films. The surface coated films are uniform and smooth. These pictures are observed under digital microscope machine with 100,00 $\mu\text{m}/\text{div}$. of area width. The layered structure of spin coated films are showed clearly through the cross-sectional areas which have thickness of films are about $\pm 10 \mu\text{m}$.

Key Words : PED, spin-coated film, layered structure, the thickness of films

1. Introduction

Polymer based light-emitting diodes (LED) were discovered in 1990 by Friend and his colleagues at Cavendish Laboratory, Cambridge University. Since then, the studies of LEPs have rapidly grown in both from academic and industrial research. Many different polymers have been shown to emit light under the application of an electric field (electroluminescence, EL). PPV and its derivatives are still the most commonly used materials, but polythiophenes, polypyridines, poly(pyridyl vinylenes), polyphenylenes and copolymers of these materials are now being used ¹⁾.

The extent application of Polymer based light emitting diodes from cellular phone, flat panel display, loan battery, organic transistor, printer pull circuit, have inspired us to develop light emitting polymer device. Our research efforts in the area of polymer opt-electronic devices focuses on build layered structure. Continuously electronic luminance and display colors of electronic device are depend on layered structure of built device. PolyAlkylThiophene-6 and polyquinoline are conducting polymers with highly π -conjugated main chain. The basic structure of polymer electronic device (PED) are comprise of glass substrate, ITO anode, polymer layers and cathode (Al or Ca) ²⁾. Based

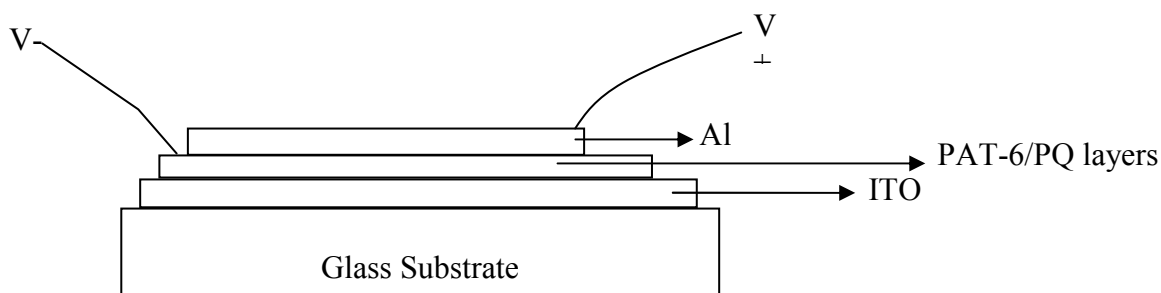


Figure 1. The Proposed Structure of PED

on the basic structure of PED, we propose the following structure which comprise of glass substrate, ITO anode, PAT-6/PQ films as a polymer layers, Al cathode.

The aims of this research are To build layered structure of PAT-6/PQ films and Observing the surface structure of films and cross sectional areas of built device.

2. Experimental

The films are made by spin coating method. Spin coating of polymers is a simple technique, which is widely used for producing very thin organic films by applying centrifugal force, linear shear stress, and uniform evaporation of a polymer solution on a rotating disk or a substrate. In the spin casting process, a solution of polymer is first deposited on the substrate, and the substrate is then accelerated rapidly to the desired rotation rate. During rotation, the polymer solution flows radially outward owing to the action of centrifugal force, its thickness being changed. Final film thickness is based on the initial properties of the polymer, solvent, and spin speed; it is independent of the size of the substrate. The

film continues to thin slowly until the film reaches an equilibrium thickness. The final thinning of the film is then due solely to solvent evaporation.

The 0,5% polymer solution was made by dissolving PAT-6 and PQ into chloroform. The polymer solution was dropped on the surface of ITO glasses and spun for 20 second to get films. Observed the surface of spun glasses under digital microscope machine and the cross sectional area under SEM machine.

3. Result and Discussions

The surface coated Films in figure 2 are uniform and smooth. These pictures are observed under digital microscope machine with 100,00 $\mu\text{m}/\text{div}$. of area width.

Next, I am want to convince you about layered structure we proposed compared with the films we made. Based on proposed structure, in the figure 4 shows two different regions which are polymer layered region and ITO region. Figure 6 is three dimensional picture of figure 4 and shows the unevenness surface structure. As you see, there is a kind of border between polymers

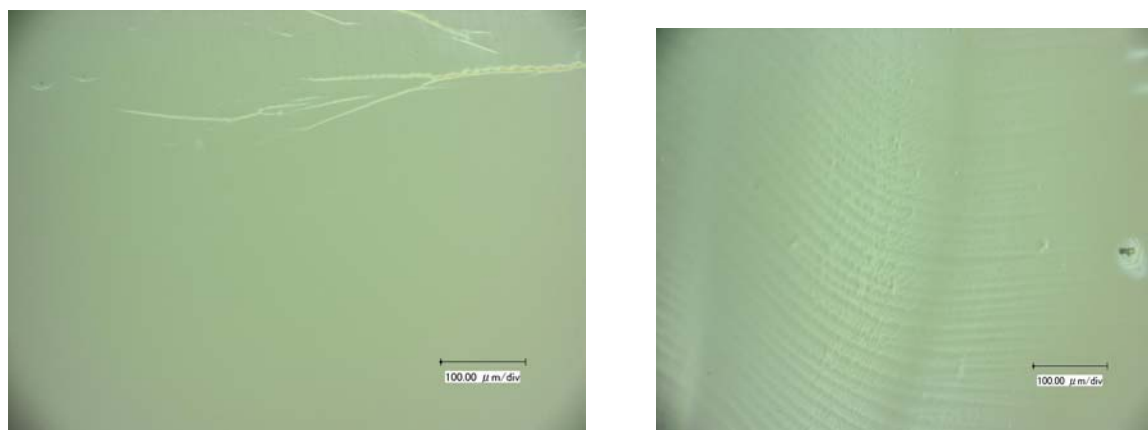
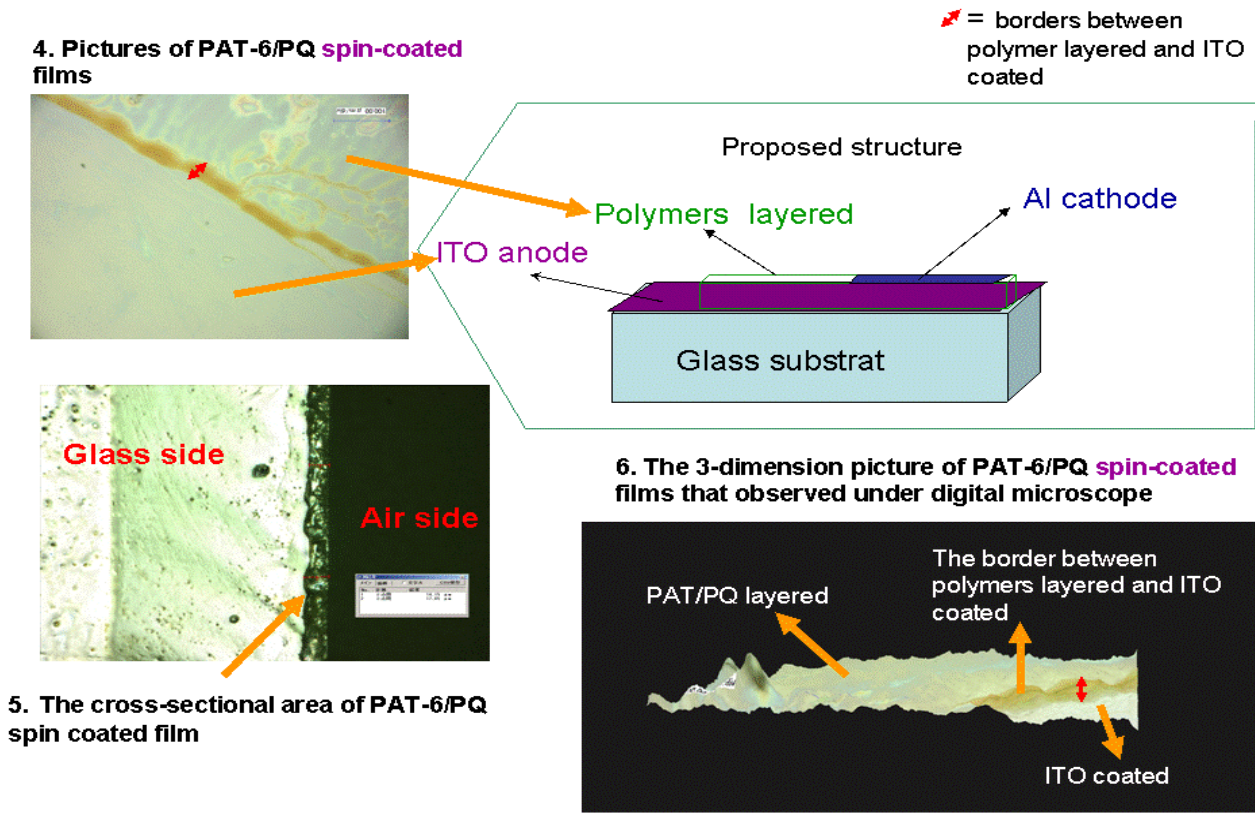


Figure 2. The surface picture of PAT-6/PQ spin-coated film



Cross-sectional SEM's Pictures of PAT-6/PQ coated films

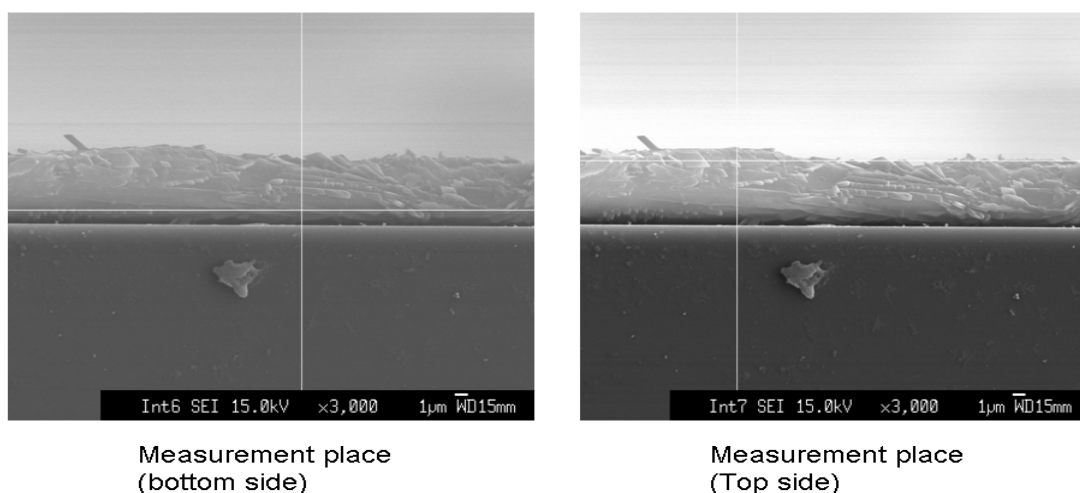


Figure 7. Cross-sectional areas of polymers layered and ITO - Glass

layered and ITO. Figure 5 shows the cross-sectional of polymers layered and ITO-glass side.

The layered structure of spin coated films are showed clearly through the cross-sectional areas in figure 7. The films thickness are about $\pm 10 \mu\text{m}$.

4. Conclusions

1. The layered structure of PAT-6/PQ films have made by us successfully.
2. The surface films which made by spin-coating method are uniform and smooth
3. The thickness of films are $\pm 10 \mu\text{m}$.

5. Acknowledgements

This research is the result of the efforts of the PED's team of Yamagata University. Special thanks is given to Prof. ORIHARA Katsuo who has given me a great chance working in his laboratory. I want to thanks also to Papua's government which fund me for this research.

6. References

- Burroughnes, J.H., Bradley, D. D. C., Brown, A. R., Marks, R. N., Friend, R. H., and Gymer, R. W., *Chemical tuning of electroluminescent copolymers to improve emission efficiencies and allow patterning*. Nature **356**, 47-49 (1982)
- Orihara, K., Asano N., Dai Y., Kondo T., Ando A., Oikawa A., Tan N., Hirooka T., Oki K., *Proced. FCFP-XIII, Quanzhou, China*, p.260 (2003)
- Holton, W. C., *Light-emitting polymers: Increasing promise*, Solid State Technology, May, 163-169 (1997)

Synthesis Of Tetrapropylammonium Tetrathiotungstate As Photocatalyst Precursor For Water Splitting

Fadhli Hadana Rahman¹, Mohammad Kassim¹, Rusli Daik¹, Khuzaimah² and Wan Ramli Wan Daud²

¹School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600, Selangor, Malaysia
e-mail: f_hadana04@yahoo.com, mbkassim@pkrisc.cc.ukm.my & rusli@pkrisc.cc.ukm.my

²Department of Chemical and Process Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600, Selangor, Malaysia
email: me140903@yahoo.com & wramli@eng.ukm.my

Abstract

The metathesis reaction of aqueous solutions of tetrapropylammonium bromide with ammonium tetrathiotungstate in the absence of oxidizing agent afforded the mononuclear tetrapropylammonium tetrathiotungstate complex, abbreviated as $[(Pr_4N)_2(WS_4)]$. The complex has been crystallographically and spectroscopically characterized. The crystal adopted a monoclinic system with $a = 15.4246(2) \text{ \AA}$, $b = 29.7390(1) \text{ \AA}$, $c = 16.5056(2) \text{ \AA}$ and $\beta = 114.11^\circ$ and belong to the $P2(1)/n$ space group. The characteristic W-S stretching mode was detected at 446 cm^{-1} . The crystal structure showed a highly disordered tetrapropylammonium molecule involving the position of the C and N atoms. Results of preliminary investigation on the reaction of $[(Pr_4N)_2(WS_4)]$ with ethylenedicarboxylate to produce a precursor for tris(dithiolene) tungsten photocatalyst are presented.

Keywords: Tetrathiotungstate, photocatalyst, tungsten, water splitting, renewable energy

1. Introduction

Hydrogen is one of the simplest and most abundant elements in the universe. It has the power to set stars ablaze. But here on earth, it is usually bound to other elements, so it must be extracted to utilize its energy. The basic science for the conversion has been around, but turning it into practical business technology has been tough. Until today, hydrogen is alluring because it burns so cleanly. It is considered the fuel for the future because the product of energy conversion is pure water. It is clean and save energy for the environment. Unlike fossil fuel which burn to produce CO, CO₂ and NO_x, the combustion of hydrogen in fuel cell system produce water.

There are several ways to get hydrogen gas such as a steam reforming process (methanol reforming), biological process (using algae,

enzymes) and the envy of all through photolysis of water (Humphry-Baker 1997).

A number of catalysts can be used in water splitting reaction. Some of these include titanium dioxide (TiO₂), zinc oxide (ZnO), strontium oxide (SnO₂), tungsten oxide (WO₃) and Fe₂O₃. Among the criteria for an efficient catalyst are it must be not be oxidized during the reaction, a good electron donor, stable towards heat and electromagnetic radiations. In addition it should also have an efficient charge distribution on the surface of the reaction sites.

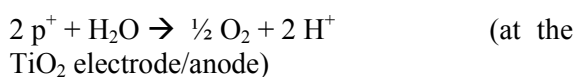
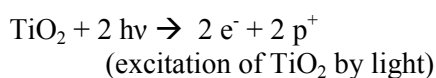
Titanium oxide, TiO₂, is one of the catalysts which have been used as an anode, coupled with a platinum black cathode, to produce hydrogen (Fujishima 1972). Low absorption of light energy, inefficient charge distribution and low current efficiency of titanium dioxide contributed to a number of unnecessary side

reactions. Another catalyst potential catalyst is tungsten oxide (WO₃) which shows very high photocurrent generation efficiencies. A combination of this material with other molecules such as dithiolenes which has a good tendency to absorb light energy will become a promising photocatalyst for the future.

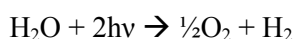
The ability of tris(dithiolene) tungsten as photocatalyst has been demonstrated in a water splitting reaction (Samios et al. 1998). Based on the performance shown in the study it will be a capable candidate to be used as photocatalyst for hydrogen production from water using solar energy. Recent work on this area has shown that heterogenous catalyst is more efficient compared to homogenous catalyst (Serpone 1997).

An important step in producing this photocatalyst is the synthesis of its precursor. Heterogenous photocatalyst such as tris(dithiolene) tungsten is actively being developed as an active material on a photoelectrode. Significant effort has been taken to develop photocatalyst that can catalytically split water molecule with the help of electromagnetic radiation (Fadhli et al. 2003). The ability of homogenous tris(dithiolene) catalyst to split hydrogen and oxygen from water without the need to add consumable (sacrificial) donor is unique and highly desirable.

Water can be split by visible light into hydrogen and oxygen, without the application of any external voltage, according to the following schemes (Fujishima 1972):



Therefore, the overall reaction is:



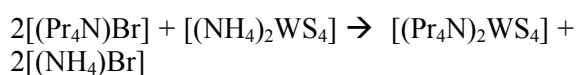
An approximately 2eV between a conduction and valence band edges is required for a material to be used as a photocatalyst. In addition, the material should have a strong optical absorption for electromagnetic radiations (preferentially in the visible and

ultraviolet spectral regions) and stable in strong electrolytes. The catalyst material should be able to facilitate an efficient charge transfer between the semiconductor layer and the electrolyte.

Tetrapropylammonium tetrathiotungstate offers a number of advantages as a precursor for photocatalyst (Fadhli 2004). The tetrathiotungstate salt offers a shorter synthesis route for realizing the tri(dithiolene) tungstate photocatalyst. The synthetic approach also allows other analogues to be synthesized by varying the alkyl/aryl groups attached to the ethylene backbone. In order to facilitate immobilization of the photocatalyst onto a photo active support such as TiO₂ functional group such as carboxylate electrode will be attached to the alkyl/aryl substituent.

3. Experimental

Tetrapropylammonium tetrathiotungstate, [(Pr₄N)₂WS₄], was prepared according to a published method (Umakoshi et al. 2000). A solution of [(NH₄)₂WS₄] (6 mmol) was added to an aqueous solution of [(Pr₄N)Br] (43 mmol) and the mixture was stirred for 5 minutes at 20°C. The chemical reaction involved is showed below. The resulting orange solution was cooled in an ice bath overnight affording a yellowish orange precipitate. The solid was filtered, washed thoroughly with diethyl ether and dried in *vacuo*.



The precursor, was characterized by spectroscopic techniques such Fourier transform infra-red (FTIR) and ultra violet and visible (UV/Vis). The carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur (CHN-S) content of the product was determined by elemental analysis. A suitable crystal suitable for single crystal diffraction studies by Bruker SMART APEX diffractometer was obtained by a slow evaporation of the aqueous solution containing the product molecules.

4. Result and Discussion

The UV/Vis and infra-red spectra of the precursor were in agreement with previously reported results (Alonso 2001). The UV/Vis spectrum exhibits three characteristics absorption bands due to the tetrahedral [WS₄] group in the UV range at 218, 278 and 395 nm.

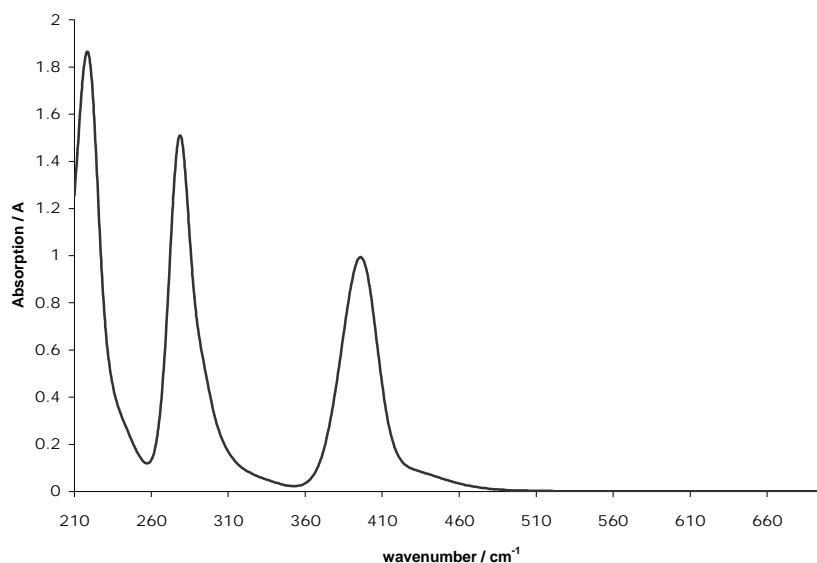


Figure 1. UV-Vis spectrum of [(Pr₄N)₂WS₄].

Table 1. Infrared characteristic of the [(Pr₄N)₂WS₄].

Wavenumber (cm ⁻¹)	446	1470	2900-3000
Functional Group	(W-S) bond	(C-H) aliphatic	(C-N) ammonium group

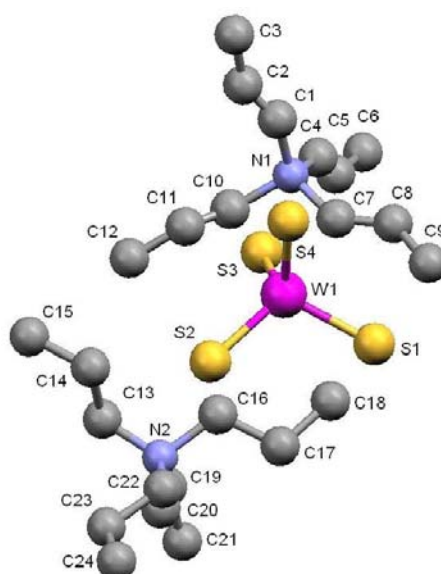


Figure 2. One of the [(Pr₄N)₂WS₄] molecules in the unit cell (H atoms were omitted for clarity).

Infra-red spectrum of [(Pr₄N)₂WS₄] shows the present of W-S stretching mode at 446 cm⁻¹ (Table 1). In addition, the infrared spectra also exhibited the characteristic stretching frequencies for C-H aliphatic and ammonium group at 2900-3000 and at 1460-1480 cm⁻¹, respectively.

The ultra violet and visible spectra of [(Pr₄N)₂WS₄] was recorded in methanol solution. There are three main transition bands corresponding to tetrahedral groups and these bands were detected at 395.93, 278.68 and 218.52 nm (Figure 1).

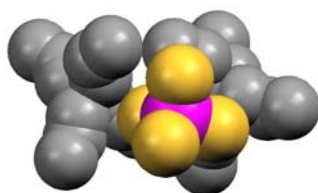


Figure 3. The space filling model of the precursor $[(Pr_4N)_2WS_4]$.

The C, H, N and S elemental analysis for $[(Pr_4N)_2WS_4]$ showed the expected results within the experimental errors. The specimen exhibited the following results; C = 42.72% (42.10%), H = 8.90% (8.18%), N = 5.23% (4.09%) and S = 18.94% (18.71%) with theoretical values shown in parenthesis.

The X-ray diffraction studies gave a monoclinic crystal system with $a = 15.4246 \text{ \AA}$, $b = 29.7390 \text{ \AA}$, $c = 16.5056 \text{ \AA}$; $\beta = 114.11^\circ$. The crystal adopts a $P2(1)/n$ space group and there are two $[(Pr_4N)_2WS_4]$ molecules and one solvent (acetone) molecule in the asymmetric unit (Figure 2). Space filling model of tetrapropylammonium tetrathiotungstate shows in Figure 3.

The structure showed a highly disordered tetrapropylammonium group which was resolved by applying restriction on the positions and bond lengths of the atoms involved in the disordered components. The geometry, bond distances and angles around the tungsten atom are within the range of tetrahedrally coordinated tungsten (Srinivasan et al. 2002 & 2004).

5. Conclusion

Tetrapropylammonium tetrathiotungstate, a precursor for the tris(dithiolene) photocatalyst was successfully synthesized. The analytical and spectroscopic data were in agreement with previously reported results. The X-ray single crystal shows the expected structure of the molecules. The synthesis route is very promising for the production of photocatalyst for hydrogen production.

6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Malaysian Ministry of Science Technology and Innovation for funding this project under the IRPA grant number 02-02-02-0006 PR0023/11-11.

7. References

- Alonso, G., Berhault, G. and Chianelli, R. R., (2001). Synthesis and Characterization of Tetraalkylammonium Thiomolybdates and Thiotungstate in Aqueous Solution. *Inorganica Chimica Acta*, **316**, 105-109.
- Fadhli Hadana Rahman, Rusli Daik & Wan Ramli Wan Daud., (2003). Synthesis and characterization of tris(dithiolene) tungsten photocatalyst for production of hydrogen gas in fuel cell application. *Proceedings Advances in Malaysian Fuel Cell Research and Development*. 203-206.
- Fadhli Hadana Rahman, Mohammad Kassim, Rusli Daik & Wan Ramli Wan Daud., (2004). Dithiolene tungsten photocatalyst precursor for water electrolysis. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia (Universitas Sumatera Utara)*, B-03-1 – B-03-5.
- Fujishima A. and Honda K., (1972). Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode, *Nature*, **238**, 37-38.
- Humphry-Baker, R., Mitsopoulou, C. A., Katakis, D. and Vrachnou, E., (1997). Photophysical Study of the Decomposition of Water Using Visible Light and Tungsten Tris(dithiolene) as Photosensitizers-Catalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **114**, 137-144.
- Samios, J., Katakis, D., Dellis, D., Lyris, E., Mitsopoulou, C. A., (1998). Solvation and Catalyst-Substrate Superstructure of a Tungsten Tris(dithiolene) Complex Dissolved in Water-Acetone. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 3169-3175.

Serpone, N., (1997). Relative Photonic Efficiencies and Quantum Yields in Heterogeneous Photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **104**, 1-12.

Srinivasan, R. B., Dhuri, S. N., Näther, C., & Bensch, W. 2002. Ethylenediammonium tetrathiotungstate(VI), *Acta Cryst.* **E58**, m622-m624.

Srinivasan, R. B., Poisot M., Näther, C., & Bensch, W. 2002. Ethylenediammonium tetrathiotungstate(VI), *Acta Cryst.* **E60**, i136-i138.

Umakoshi, K., Nishimoto, E., Sokolov, M., Kawano, H., Sasaki, Y., Onishi, M., (2000). Synthesis, Structure and Properties of Sulfide-Bridge Dinuclear Tungsten(V) Complex of Dithiolene. *Journal of Organometallic Chemistry*, **611**, 370-375.

Kompleks Ion Logam Besi Dengan Ligan Di-2-piridil keton

Fahimah Martak¹⁾, Djulia Onggo¹⁾, Mimin A. ¹⁾, Bohari M. Yamin²⁾, Seik Weng Ng³⁾

Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia
e-mail : djulia@chem.itb.ac.id

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, University Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
Department of Chemistry, University of Malaya
50603 Kuala Lumpur, Malaysia

Abstrak

Ligan di-2-piridil keton (dpk) merupakan ligan bidentat dengan gugus karbonil diantara dua cincin piridin. Reaksi antara ion besi(II) dengan ligan ini menghasilkan kompleks berinti satu yang sangat bergantung pada jenis pelarut yang digunakan. Dengan pelarut etanol dihasilkan kompleks besi(II) dengan dua molekul ligan terhidrasi. Rumus molekul kompleks yang dihasilkan $[Fe(dpk)_2](BF_4)$. Ini dibuktikan dari data momen magnet sebesar 1,88 BM yang sesuai dengan keberadaan ion besi(III) dengan keadaan spin rendah. Spektra infra merah menunjukkan pita lebar pada $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ yang sesuai dengan adanya gugus OH ligan terhidrasi. Kristal tunggal kompleks $[Fe(dpk)_2](BF_4)$ telah berhasil ditumbuhkan dan data difraksi sinar-X untuk kristal tersebut menunjukkan struktur oktahedral dengan ikatan antara ion besi(III) dengan atom donor N dan O dari ligan terhidrasi.

Kata kunci: senyawa kompleks besi, sifat magnet, struktur kristal.

1. Pendahuluan

Ligan di-2-piridil keton (dpk) merupakan ligan turunan bipyridin, yang mengandung gugus karbonil diantara dua cincin piridin. Kekuatan ligan ini sebesar 10.638 cm^{-1} pada kompleks $[Ni(dpk)_3](ClO_4)_2$,¹ sehingga ligan ini berpotensi sebagai pembentuk senyawa spin transisi untuk besi(II).

Kompleks kobalt(II) dengan ligan dpk telah dilaporkan¹. Bilangan koordinasi 4 diperoleh untuk senyawa kompleks $[Co(dpk)_2](NO_3)_2$ yang memiliki struktur segi empat datar². Ini dibuktikan dari data C, H, dan N analyser yang sesuai dengan dua ligan yang terkoordinasi pada logam Co(II).

Kompleks tembaga(II) dengan ligan dpk telah berhasil disintesis² dan data kital tunggal menunjukkan dua ligan dpk terhidrasi, sehingga membentuk kompleks oktahedral dengan ion tembaga(II).

Terjadinya transisi spin pada senyawa ini

kemungkinan dipengaruhi oleh kemudahan gugus karbonil pada ligan di-2-piridinketon untuk mengalami hidrasi. Dengan demikian ligan di-2-piridinketon digunakan sebagai model untuk mengetahui jumlah atom donor terhadap sifat senyawa kompleks. Sifat senyawa kompleks yang dipelajari meliputi sifat magnet, stereokimia dan struktur. Pada makalah ini dibahas lebih dalam perilaku senyawa kompleks besi(II) dengan ligan di-2-piridinketon dan proses hidrasi ligan dpk.

2. Percobaan

Senyawa kompleks besi(II) dengan ligan di-2-piridinketon dibuat dengan modifikasi cara yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya¹. Sebanyak 1,10 gram kristal di-2-piridinketon dilarutkan dalam 10 ml etanol, kedalam larutan tersebut ditambahkan 0,91 gram $Fe(BF_4)_2 \cdot 6H_2O$ yang dilarutkan dalam 10 ml etanol. Pada proses sintesis senyawa kompleks Fe(II) dengan ligan dpk diperlukan kondisi bebas oksigen, oleh karena itu digunakan aliran gas

Tabel 1. Hasil Analisis Kadar Komponen-komponen Peyusun Senyawa Kompleks

Senyawa	Kadar komponen penyusun (%)			
	C	H	N	Fe
[Fe(dpkh) ₂](BF ₄)	45,38 (45,89)	3,54 (3,51)	9,35 (9,76)	9,41 (9,70)
[Fe(dpkh) ₃](ClO ₄) ₂	45,38 (46,01)	3,54 (3,81)	9,35 (9,76)	6,92 (6,48)

(.....)= hasil perhitungan teoritis

Tabel 2. Data Momen Magnet Kompleks Besi dengan Ligan Di-2-piridinketon

Kompleks	R	χ_g	μ
[Fe(dpkh) ₂](BF ₄)	89	$2,09 \cdot 10^{-6}$	1,88
[Fe(dpkh) ₃](ClO ₄) ₂	965	$12,51 \cdot 10^{-6}$	5,10

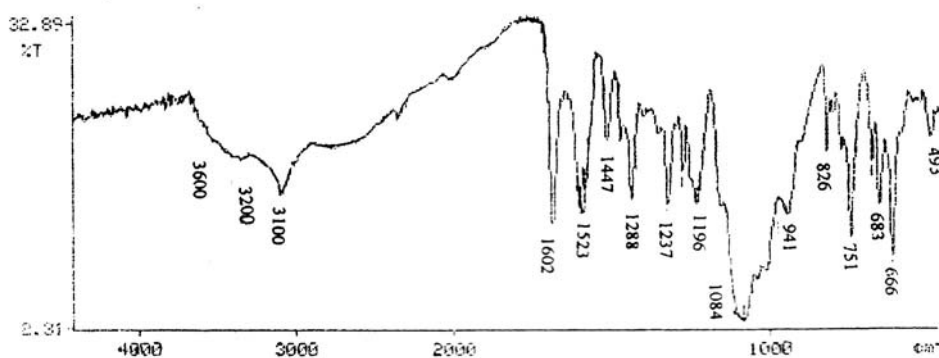
nitrogen. Setelah reaksi berlangsung sempurna, kristal disaring dengan kaca masir G-4 dan dicuci dengan aseton dan dietil eter. Endapan yang diperoleh dikeringkan dengan serbuk P₄O₁₀ dalam desikator hampa. Pengerjaan yang sama dilakukan dalam pelarut aseton, disini digunakan 0,72 gram besi(II) perklorat heksahidrat dalam 10 ml aseton. Kristal tunggal diperoleh dari reaksi antara 0,17 gram Fe(BF₄)₂·6H₂O yang dilarutkan dalam 8 ml metanol dan 0,18 gram dalam 8 ml etanol. Kristal oranye kompleks [Fe(dpkh)₂](BF₄) terbentuk setelah satu minggu.

3. Hasil dan pembahasan

Senyawa kompleks yang dihasilkan memiliki rumus molekul [Fe(dpkh)₂](BF₄) dan [Fe(dpkh)₃](ClO₄)₂. Ini dibuktikan dari data

Kompleks Fe(II) di-2-piridinketon yang diperoleh dengan pelarut etanol menghasilkan kompleks besi(III) spin rendah. Sedangkan reaksi ion Fe(II) dengan ligan di-2-piridinketon yang diperoleh dengan pelarut aseton dihasilkan kompleks besi(II) spin tinggi. Hasil perhitungan momen magnet kedua senyawa kompleks yang dihasilkan dari kedua pelarut berbeda ditunjukkan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil perhitungan secara teoritis kompleks yang disintesis dengan pelarut etanol diperoleh harga momen magnet kompleks besi(III) spin rendah sebesar 1,73 BM, namun hasil eksperimen menunjukkan 1,88 BM, ini berarti momen magnet yang dihasilkan tidak hanya dipengaruhi oleh sumbangan spin saja tetapi juga berasal dari sumbangan orbital.

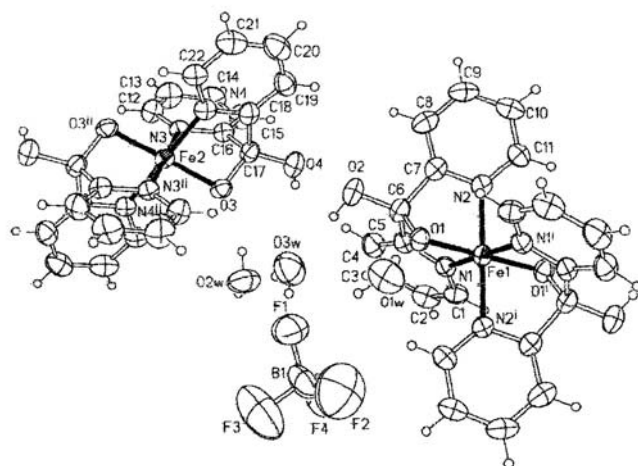


Gambar 1. Spektrum inframerah senyawa kompleks [Fe(dpkh)₂](BF₄)

kandungan unsur besi, C, H, N yang terangkum dalam Tabel 1.

Hasil perhitungan momen magnet diperoleh dari pengukuran neraca kerentanan magnet.

Nilai momen magnet untuk kompleks besi(II) spin tinggi 4,9 BM, hasil yang diperoleh dari eksperimen 5,10 BM, ini berarti efek orbital juga memberi sumbangan pada senyawa kompleks yang dihasilkan dari pelarut aseton.



Gambar 2. Struktur kristal kompleks $[\text{Fe}(\text{dpkh})_2](\text{BF}_4)$ dari difraksi sinar X kristal tunggal.

Spektra inframerah kompleks yang disintesis dengan pelarut etanol menunjukkan gugus O—H pada bilangan gelombang $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ dan didukung oleh adanya vibrasi ulur C—O untuk C—OH pada 1084 cm^{-1} . Adanya puncak lemah pada bilangan gelombang 2922 cm^{-1} berasal dari vibrasi ulur C—H. Puncak serapan C—H aromatik pada bilangan gelombang 1602 , 1523 dan 1447 cm^{-1} . Puncak pada bilangan gelombang 1288 dan 1237 cm^{-1} berasal dari kombinasi antra vibrasi ulur C=C dan dengan vibrasi bending C—O. Puncak serapan yang berasal dari vibrasi ulur ikatan koordinasi Fe—N pada bilangan gelombang 666 cm^{-1} . Berdasarkan data diatas, senyawa koordinasi yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut etanol, ligan terhidrasi dan berkoordinasi dengan ion logam. Vibrasi ulur ikatan koordinasi Fe—N pada kompleks yang dihasilkan dengan pelarut aseton pada bilangan gelombang yang lebih pendek yaitu 642 cm^{-1} . Berdasarkan data tersebut kompleks yang dihasilkan dengan pelarut etanol lebih stabil dibandingkan kompleks yang disintesis dengan pelarut aseton. Spektrum inframerah senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{dpkh})_2](\text{BF}_4)$ disajikan pada Gambar 1.

Telah ditumbuhkan kristal tunggal kompleks Fe(II) dengan ligan di-2-piridinketon. Kristal berhasil disintesis dari larutan $\text{Fe}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan ligan di-2-piridinketon dalam pelarut etanol. Kristal berwarna oranye tumbuh dalam waktu 1 minggu. Dari hasil analisis difraksi sinar-X single kristal, ternyata ligan terhidrasi membentuk ion ion negatif, ligan bersifat tridentat, jadi dua ligan yang terkoordinasi dan

ion besi(II) teroksidasi menjadi besi(III). Struktur kristal kompleks $[\text{Fe}(\text{dpkh})_2](\text{BF}_4)$ dari difraksi sinar X kristal tunggal ditunjukkan pada Gambar 2.

4. Kesimpulan

Kristal kompleks besi(II)-di-2-piridinketon yang disintesis dari pelarut etanol merupakan kompleks bis ligan dengan formula $[\text{Fe}(\text{dpkh})_2](\text{BF}_4)$, kristal berwarna oranye dan bersifat spin rendah. Senyawa koordinasi besi(II) dengan ligan di-2-piridinketon telah disintesis dengan pelarut aseton membentuk kompleks yang berwarna hijau tua, memiliki formula $[\text{Fe}(\text{dpkh})_3](\text{ClO}_4)_2$, spin tinggi dan bersifat paramagnet.

5. Daftar Pustaka

- Sumarna, O. (1996). Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Besi(II), Kobalt(II) dan Nikel(II) dengan Menggunakan Ligan-ligan Turunan 2,2'-bipiridin. Tugas Akhir, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.
- Suyanti, R.D. (1997). Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Tembaga(II) dengan Ligan-ligan Bidentat yang Mengandung Atom Nitrogen Sebagai Atom Donor. Tugas Akhir, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.
- Feller, M.C., Robson, R., (1970). Complexes of Di-2-pyridyl Ketone, Australian Journal of Chemistry, **23**, 1997-2003.
- Day, M.C., Selbin, J., (1969). Theoretical Inorganic Chemistry, (2nd.Ed), Van Norstrand Reinhold Company, 391-397.
- Huheey, J.E., (1983). Inorganic Chemistry, Principle of Structure and Reactivity, (3rd.Ed), Harper and Row, Singapore, 359-441.

Fahimah Martak, Djulia Onggo, Mimin A, Bohari M. Yamin, Seik Weng Ng

- Shriver, D.F., Atkins, P.W., Longford, C.H., (1990). Inorganic Chemistry, Oxford University Press, Oxvford, 434-486.
- Braun, R.D., (1987). Introduction to Instrumental Analysis, (2nd.Ed), McGraw-Hill International Edition, New York, 932-941.
- Stroble, H.A., (1973). Chemical Instrumentation : A Systematic Approach, (2nd.Ed), Addison-Wesley Publishing Company Inc., Philippines, 763-774.
- Wendlant, W., (1986). Thermal Analysis, (3rd.Ed), John Wiley and Sons, Toronto, 56-57.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., (1992). Fundamental of Analytical Chemistry, (6th.Ed), Saunders College Publishing, New York, 616-632.
- Angelici, R.J., (1977). Synthesis and Technicue in Inorganic Chemistry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 42-50.
- Mabbs, F.E., (1973). Machnetism and Transition Metal Complexes, Chapman and Hall, London, 1-12.
- William, D.H., Fleming, I., (1980). Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, (3rd. Ed), McGraw-Hill Book Company, London.
- Nakamoto, K., (1963). Infrared Spectra of Inorganic Chemistry and Coordination Compounds, John Wiley and Sons, Inc. New York, 5-7.
- West, A.R., Solid State Chemistry and Its Applications, John Wiley and Sons, Singapore, 104-113.

Glomerella cingulata cutinase: *In silico* protein modeling

Farah Diba Abu Bakar¹, Fauziah Hanim Shaarani¹, Sheila Nathan^{1,2},
Nor Muhammad Mahadi^{1,2} and Abd. Munir Abd. Murad^{1,2}

¹School of Biosciences and Biotechnology,
Faculty of Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi.

²Interim Laboratory,
National Institute for Genomics and Molecular Biology,
UKM-MTDC Smart Technology Centre, 43600 Bangi.

Email : fabyff@pkriscc.ukm.my

Abstract

The *G. cingulata* cutinase (GcCUTA) three-dimensional structure was predicted by comparative modelling methods using the 3D cutinase structure of *Fusarium solani* f. *pisi* (1CEX), as template. Sequence identity between these two cutinase is 53%. An initial model of GcCUTA was built using Modeller6v2 before visualization and minimization were done using modules in InsightII. The GcCUTA structure consists of 193 amino acid residues and the root-mean-square (RMS) deviation of GcCUTA against 1CEX is about 0.265291 Å. Evaluation of GcCUTA using ERRAT gives 99.5% residues below the 95% confidence limit. The Ramachandran plot of the model showed that 89.6% of the residues are in the favoured region. The final model showed that GcCUTA consists of five parallel strands and five helices. Alignment and analysis of the amino acid sequence show that the catalytic triad of GcCUTA corresponds to Ser105, Asp160 and His173 and the oxyanion hole corresponds to Ser26 and Gln106. Several residues of GcCUTA have been postulated to be involved in enzyme-ligand binding interaction. These targeted residues are being mutagenised and the enzyme activity of these mutagenised products will be studied *in silico* and *in vitro*. This study has been initiated in an effort to provide insight into the relationship between protein structure and biological function.

Keywords : Cutinase, protein homology modeling, *in silico* mutagenesis, protein-ligand interaction

1. Introduction

Cutinases are lipolytic enzymes capable of degrading a major constituent of the plant cuticle called cutin (Kollatukudy 1984). It belongs to the class of serine esterase that contains the catalytic triad consisting of the residue serine, histidine and aspartate (Carvalho *et al.*, 1998). Analogous to the serine proteases, cutinase contains an oxyanion hole consisting of the main chain nitrogens of serine and glutamine (Martinez *et al.*, 1994).

Fusarium solani f. *pisi* cutinase remains the only cutinase characterised by X-ray

crystallography. To date, there are about 40 structures of *F. solani* cutinase and its mutants in the Protein Data Bank (Martinez *et al.*, 1992) and *G. cingulata* cutinase (GcCUTA) gives 53% sequence identity to *F. solani* cutinase enzyme.

Comparative modeling is one of the methods that can be used in predicting the three-dimensional structure of an amino acid sequence (the target) on the basis of already known protein structures (the template) (Boissel *et al.*, 1993). It is an increasingly fast and efficient way to obtain useful information

about proteins of interest. Comparative models can be helpful in identifying active and binding sites (Ring *et al.*, 1993) as well as designing mutants in the purpose of studying the protein's function (Marti-Renom *et al.*, 2000).

2. Methodology

***G. cingulata* cutinase model building, refinement and verification.**

The *G. cingulata* cutinase (*GcCUTA*) gene sequence was obtained from the GenBank database of NCBI with the accession number AF444194. This gene was isolated from the *G. cingulata* genomic library (Farah Diba *et al.*, 2001). The amino acid sequence of GcCUTA was displayed as a FASTA format and downloaded. The coordinates of the three-dimensional *F. solani* f. *pisi* cutinase (ICEX) was chosen as the template. GcCUTA was aligned with ICEX using the Homology module of InsightII. The pairwise of target and template sequences were automatically aligned and logged on to a server running Modeller6V2. An initial model was built using Modeller6V2 for automated comparative modeling. The initial model was loaded into InsightII module for visualization.

Hydrogen atoms were added to the model structure using Builder module of InsightII. The Consistent Valence ForceField (CVFF) was chosen and the correct atom potentials were fixed. The minor steric clashes and bond strains due to the building of the model were regularized using Discover. The whole model was considered for energy minimization. The correctness of the GcCUTA model was evaluated using Verify3D, Errat and Ramachandran plot that are available at www.doe-mbi.ucla.edu/verify3d.html, www.doe-mbi.ucla.edu/errat_server.html and <http://raven.bioc.cam.ac.uk/rampage.php>. The pdb format of the model was submitted to the server independently.

In silico mutagenesis of GcCUTA

Several residues of GcCUTA have been postulated to be involved in enzyme-ligand binding interactions. Some of these targeted residues were mutagenised *in silico*. The generation of S26A, N69D and S105A mutants was carried out via the Homology module of InsightII.

3. Results and Discussion

Alignment and analysis of the ICEX and GcCUTA amino acid sequences show that the catalytic triad of GcCUTA are positioned at Ser105, Asp160 and His173 and the oxyanion hole residues are Ser26 and Gln106 (Figure 1).

The final structure of GcCUTA consists of 193 amino acid residues and 1426 atoms. It comprises five beta strands and five alpha helices (Figure 2). Superimposition of carbon alpha atoms produced a root-mean-square (RMS) deviation of 0.265 Å.

Evaluation of the final model using ERRAT showed 96.2% at below 95% confidence level limit (Table 1). This method involves analyzing the statistics of non-bonded interaction between different atom types. The output plot is produced by the value of the error function versus position of amino acid residues. The results indicate that the GcCUTA model is reliable and the structure is significantly correct (Colovos and Yeates 1993).

Evaluation of the final model using Verify3D showed that the average score is above the 0.1 level. This indicates that the structure is correctly folded (Luthy *et al.*, 1992). Verify3D of GcCUTA shows that 79.90% of the residues had an average of 3D-1D score of more than 0.2 (Table 1).

The Ramachandran plot for GcCUTA structure showed that 90.2% of the residues are in the most favoured region (Table 1). This method shows the phi (ϕ) – psi (ψ) torsion angles for all residues of GcCUTA structure (Laskowski *et al.*, 1994).

The GcCUTA protein model may provide enough spatial information to guide certain experiments such as mutagenesis and binding interaction studies. However, it remains a predicted structure and less reliable than an empirical crystallography or NMR structure. Thus, to verify the predicted cutinase structure, we are currently working towards protein crystallization of cutinase and X-ray crystallography. We are currently also carrying out *in silico* mutagenesis, enzyme-substrate docking simulations and *in vitro* site directed mutagenesis of the GcCUTA target residues to further study the mechanism of interaction of cutinase and its substrates.



Figure 1: Amino acid sequence alignment of *F. solani f. pisi* cutinase (ICEX) as template and *G. cingulata* cutinase (GcCUTA) as target showed 53% sequence identity

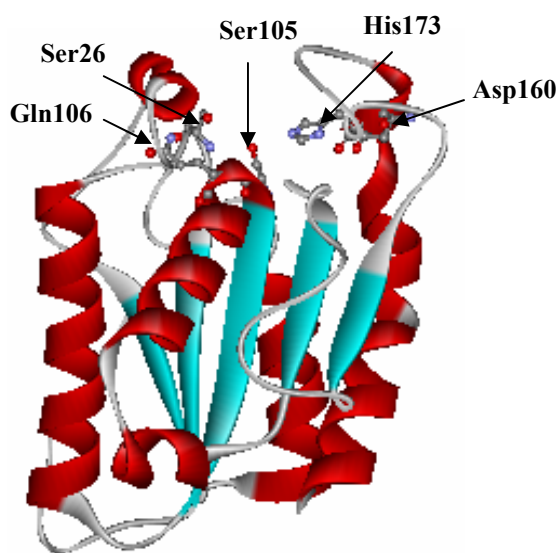


Figure 2: The predicted structure of *G. cingulata* cutinase. Ball and stick presentation represent catalytic triad residues (Ser105, Asp160 and His173) and oxanion hole residues (Ser26 and Gln106).

Table 1: Verification analyses for the GcCUTA model structure

Verification servers	Analyses results
ERRAT	96.2% below the 95% rejection limit
Verify3D	79.90% of the residues had an averaged 3D-1D score > 0.2
Ramachandran plot	90.2% of the residues in most favoured region.

4. References

Boissel, J.P., Lee, W.R., Presnell, S.R., Cohen, F.E and Bunn, H.F. 1993. *Journal of Biological Chemistry* 268: 15983-15993

Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S. 1998. *Electronics Journal of Biotechnology*. (online). 15 December, 1998. vol. 1, n. 3.

Colovos, C. and Yeates, T.O. 1993. *Protein Science* 2 (9): 1511-1519.

Farah Diba, A.B., Donna, C., Zulkeflie, Z., Mahadi, N.M. dan Patrick, S. 2001. *Asia Pasific Journal of*

Molecular Biology and Biotechnology 9 (2): 119-130.

Kolattukudy, P.E. 1984. *Lipases*. Borgstrom, B. and Brockman, H. (eds.), pp 470-504. Elsevier, Amsterdam.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Smith, D.K., Jones, D.T., Hutchinson, E.G., Morris, A.L., Naylor, D., Moss, D., and Thornton, J.M. 1994. *Procheck v.3.5.4: Operating Manual*. <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>. Accessed on February 2003.

Farah Diba Abu Bakar, Fauziah Hanim Shaarani, Sheila Nathan, Nor Muhammad Mahadi and Abd. Munir Abd. Murad

- Lüthy, R., Bowie, J.U. and Eisenberg, D. 1992. Nature 356: 83-85.
- Martinez, C., Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. and Cambillau, C. 1992. Nature 356: 615-618
- Martinez, C., Nicholas, A., van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Cudrey, C., Verger, R. and Cambillau, C. 1994. Biochemistry 33: 83-89.
- Marti-Renom, M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. and Sali. A. 2000. Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure 29: 291-325.
- Nicolas, A., Egmond, M., Verrips, T., de Vlieg, J., Longhi, S., Cambillau, C. And Martinez, C. 1996. Biochemistry 35 : 398-410.
- Ring, C.S., Sun, E., McKerrow, J.H., Lee, G.K., Rosenthal, P.J., Kuntz, I.D. and Cohen, F.E. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3583-3587.

Pemanfaatan Limbah Padat Pabrik Penyamakan Kulit Sebagai Pupuk Lengkap Organik yang Potensial

Fariati⁽¹⁾, Yudhi Utomo⁽²⁾, Evi Susanti⁽³⁾, Nugrahaningsih⁽⁴⁾

1) email: f4riati@telkom.net

1-3) Jurusan Kimia-FMIPA-Universitas Negeri Malang (UM)
Jl. Surabaya 6 Malang-East Java-Indonesia

4) Jurusan Biologi- FMIPA-Universitas Negeri Malang (UM)
Jl. Surabaya 6 Malang-East Java-Indonesia

Abstrak

Pengolahan limbah dengan menggunakan bakteri fakultatif menghasilkan limbah padat yang mengganggu proses IPAL dan juga memerlukan ketersediaan lahan penimbunan yang luas. Salah satu upaya pemecahan masalah tsb adalah pengolahan limbah padat yang kaya unsur N sebagai bahan dasar pembuatan pupuk organik. Walaupun sudah dilakukan pembuatan pupuk organik saat ini, namun kualifikasi pupuk lengkap organik (N, P, K) belum banyak dilakukan. Tujuan penelitian ini, untuk mengkompos limbah padat pabrik penyamakan kulit menjadi pupuk lengkap organik yang potensial sehingga dapat menggantikan pupuk buatan yang akan memperbaiki sifat fisis tanah. Pembuatan pupuk pada penelitian ini dengan pemilihan filler dan konsentrasi lumpur yang tepat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pupuk mengandung unsur makro yang diperlukan tanaman (N, P, K), suhu rata-rata 27^oC dan pH rata-rata=6,3 yang memenuhi standar pertumbuhan tanaman.

Kata kunci: limbah padat, pupuk lengkap organik, filler

1. Pendahuluan

PT Nasional Djawa Kulit (NDK) adalah perusahaan penyamakan kulit yang sudah berdiri sejak tahun 1950 di Singosari, kabupaten Malang. Saat ini pabrik tersebut telah berkembang menjadi pabrik kulit proses lengkap dengan kapasitas produksi 1.200.000 sq ft/tahun, tetapi masalah lain yang timbul adalah lokasi pabrik yang semula berada di luar pemukiman, menjadi berada di tengah pemukiman. Oleh karena itu keberadaan pabrik itu dipermasalahkan oleh penduduk terutama menyangkut limbah yang dihasilkannya.

Beberapa usaha yang telah dilakukan perusahaan untuk mengatasi limbah ini antara lain: membangun instalasi pengolahan air limbah (IPAL) dengan berbagai tehnik mulai sederhana sampai yang relatif modern. Pengolahan air limbah menggunakan bakteri fakultatif sedang diujicobakan dan diperoleh hasil penurunan bau yang cukup signifikan pada outlet limbah, tetapi proses ini menghasilkan limbah padat yang cukup besar

yaitu sekitar 2 ton/hari. Limbah padat ini mengganggu proses pengolahan limbah yang sedang berjalan, selain itu diperlukan lahan tambahan tempat penampungan. Usaha yang akan dilakukan adalah mendegradasi limbah padat tersebut dan mengolahnya sebagai pupuk lengkap organik yang potensial sehingga dapat menggantikan pupuk buatan yang akan memperbaiki sifat fisis tanah.

2. Percobaan

Pembuatan pupuk lengkap organik dari limbah lumpur pabrik penyamakan kulit adalah sebagai berikut:

Pemilihan filler untuk pupuk lengkap organik

Filler yang digunakan adalah: jerami dan sekam. Proses pembuatan pupuk lengkap organik adalah: mencampur limbah lumpur, filler dan kotoran ayam kemudian ditambahkan bakteri. Proses dekomposisi diamati selama 4 minggu. Indikator yang diukur adalah: pH, suhu, persen terdekomposisi, rendemen dan

Tabel 1 Bokasih dengan memakai limbah padat (lumpur) baru

Filler	Rerata berat awal	Rerata berat akhir	Rerata pH	Rerata suhu	Rerata % terdekomposisi	Rendemen
Jerami	7 Kg	3,0 Kg	6,6	31°C	90 %	43 %
Sekam	7 Kg	3,6 Kg	6,1	30°C	30 %	51 %
Jerami-sekam	8 Kg	4,8 Kg	6,2	31°C	80 %	60 %

Tabel 2 Bokasih dengan memakai lumpur lama

Filler	Rerata berat awal	Rerata berat akhir	Rerata pH	Rerata suhu	Rerata % terdekomposisi	Rendemen
Jerami	12 Kg	4,2 Kg	5,5	30°C	35 %	35 %
Sekam	12 Kg	4,6 Kg	5,3	30°C	30 %	38 %
Jerami-sekam	13 Kg	5,0 Kg	6,3	30°C	50 %	38 %

Tabel 3 Hasil Analisis Bokasih Pada Variasi Jumlah Lumpur

Bagian Lumpur	N total	P (P ₂ O ₅)	K (K ₂ O)
1	1,30	0,66 (1,51)	0,765 (0,95)
2	1,15	0,64 (1,51)	0,735 (0,89)
3	1,16	1,71 (3,91)	0,820 (0,99)



1 bagian lumpur



2 bagian lumpur



3 bagian lumpur

kadar unsur makro (N, P, K) pada pupuk yang dihasilkan.

Penentuan konsentrasi limbah lumpur untuk pupuk lengkap organik

Konsentrasi lumpur yang digunakan dengan variasi: 0,00; 0,15; 25,00; dan 33,00%. Kemudian perlakuan sama dengan proses pemilihan filler. Pupuk organik lengkap hasil penelitian dianalisis N, P, dan K

3. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Pemilihan filler untuk pupuk lengkap organik ditunjukkan pada Tabel 1.

2. Penentuan konsentrasi limbah padat untuk pupuk lengkap organik ditunjukkan pada Tabel 2.

Perbandingan lumpur terbaik dicapai pada pemakaian 3 bagian lumpur baru seperti ditunjukkan dari kadar N, P, K dan tampilan bokasih yang dihasilkan berikut ini:

Filler terbaik: campuran jerami: lumpur baru = 1:2 dengan rata-rata terdekomposisi 90%

3. Hasil degradasi limbah padat pabrik penyamakan kulit yaitu: pupuk lengkap organik padat yang mengandung unsur makro yang diperlukan tanaman (N, P, K). Data hasil analisisnya ditunjukkan pada Tabel 3.

Berdasarkan dosis pupuk yang dianjurkan untuk petani menurut BIMAS (1983): N = 90 – 170 Kg/ha, P₂O₅ = 30 – 160 Kg/ha, K₂O = 0 –

100 Kg/ha, sehingga 100g pupuk ke 2/tanaman sesuai dengan dosis pupuk anjuran Bimas.

4. Kesimpulan

Hasil Pemilihan filler untuk pupuk lengkap organik yaitu campuran jerami: lumpur baru = 1:2

Perbandingan lumpur terbaik dicapai pada pemakaian 3 bagian lumpur baru dengan kadar N = 1,15%, P = 0,64%, K = 0,735%

5. Ucapan Terima Kasih

1. Kementerian Riset Teknologi (KRT)-Proyek Riset Unggulan Kemitraan.
2. PT Nasional Djawa Kulit (NDK) Singosari-Malang-Jawa Timur-Indonesia

3. Lembaga Penelitian Universitas Negeri Malang (UM)

Daftar Pustaka

Anonim.(1999). Bokashi, Fermentasi Bahan Organik dengan Teknologi

Efektif Mikroorganisme 4, Cara Pembuatan dan Aplikasi. Jakarta: Sapta kreasi Group.

Anonim (1983). Padi Palawija Sayur-Sayuran. Jakarta: Departemen Pertanian Satuan Pengendalian BIMAS.

Fariati, Nugrahaningsih, Yudhi Utomo, Evi Susanti. (2004). Inovasi Pengolahan Limbah Pabrik Penyamakan Kulit dan Pemanfaatannya Sebagai Pupuk Organik Lengkap. Laporan RUK 2003-2004. KRT-Proyek Riset Unggulan Kemitraan.

Perubahan Citarasa Dan Nilai Nutrisi Keju Tahu Dengan Penambahan Beberapa Intermediet Metabolit Dan Kapang

F. Madayanti¹⁾, Lengga Priani¹⁾, Nurul Qomariah¹⁾, Hesti Lina¹⁾ Akhmaloka¹⁾

¹⁾Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung,
Jalan Ganeca 10 Bandung 40132, Indonesia

Abstrak

Tahu merupakan salah satu sumber protein nabati yang nilai nutrisinya paling mendekati protein hewani. Masalah waktu penyimpanan yang pendek diatasi dengan mengolah tahu menjadi keju. Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh berbagai kapang dan penambahan beberapa intermediate metabolit terhadap perubahan citarasa dan nilai nutrisi keju tahu. Asam piruvat dan α -ketoglutarat dipilih sebagai senyawa-senyawa intermediet metabolit, sedangkan *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, dan *Penicillium roquefortii* dipilih sebagai inokulum.

Untuk keju yang berumur 3-4 minggu, perlakuan dengan berbagai inokulum dan metabolit menyebabkan kenaikan kadar protein keju sekitar 5-12% % dibandingkan dengan tahu. Sedangkan kadar lemak mengalami penurunan, kecuali oleh kapang *A. niger*. Khusus untuk keju dengan penambahan metabolit, kadar lemak mengalami penurunan sampai keju berumur 1 bulan, tetapi dengan aging kadar lemak naik.

Keju yang dihasilkan secara visual dapat diterima, kecuali yang diinokulasi dengan *A. niger*. Skor penilaian organoleptik dan tingkat kesukaan panelis terhadap keju yang diinokulasi dengan *P. roquefortii* dan kombinasi *P. roquefortii* dan *R. oligosporus* memiliki derajat kesukaan yang mirip dengan Brie cheese dan Gouda cheese. Sementara itu keju yang diinokulasi dengan *R. Oligosporus* maupun yang diberi metabolit memiliki derajat kesukaan yang mirip dengan Blue cheese..

Kata Kunci : keju tahu, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, asam piruvat, α ketoglutarat, citarasa.

1. Pendahuluan

Tahu merupakan salah satu produk olahan kedelai yang murah dan enak dengan kandungan asam amino penyusun paling mendekati sumber protein hewani dan kandungan lemak yang terdiri atas 80 % dari asam lemak tak jenuh. Kadar asam lemak jenuh tahu hanya sekitar 15 % dan tidak mengandung kolesterol.¹ Tetapi, karena kadar airnya yang tinggi, maka industri rakyat ini memiliki daya simpan yang rendah (1-2 hari pada suhu ruang dan tanpa kemasan). Pengolahan tahu menjadi keju merupakan salah satu alternatif untuk mengolah tahu menjadi produk yang lebih awet.

Kebanyakan senyawa penentu citarasa keju

adalah hasil transformasi asam amino tertentu pada komponen protein bahan baku keju akibat aktivitas metabolisme mikroba yang terlibat dalam proses fermentasi pada pembuatan keju. Proses metabolisme ini kesetimbangannya dapat dipengaruhi dengan kehadiran metabolit intermediet seperti α -keto glutarat dan asam piruvat. Karena itu dalam penelitian ini akan dilihat pengaruh penggunaan penggunaan kapang *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *Penicillium rouquefotii* dan kombinasi dua kapang, juga penambahan kedua metabolit intermediet terhadap perubahan kadar protein, lemak, penerimaan dan cita rasa dari keju yang dihasilkan.

2. Percobaan

Umum. Keju dibuat dengan memfermentasi endapan protein susu kedele dengan kapang yang bervariasi: *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, *Penicillium roquefortii* atau gabungan *A.niger* & *P. Roquefortii* atau *R. oligosporus* & *P. Roquefortii*. Pengaruh penambahan metabolit intermediet (asam piruvat dan alpha-ketoglutarat) dilakukan pada saat pembuatan tahu (endapan protein) dan dilanjutkan dengan fermentasi oleh *R. oligosporus*. Komposisi lemak dan protein dianalisis pada inkubasi hari keempat, dan 3-4 minggu. Analisa organoleptik dilakukan terhadap rasa keju tahu berusia 3-4 minggu, khusus dengan penambahan metabolit intermediet uji rasa juga dilakukan terhadap keju yang berumur 2 dan 5 bulan..

Bahan. Kedelai yang digunakan dibeli di supermarket lokal. Kultur murni *Aspergillus niger* dan *Rhizopus oligosporus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung. *Penicillium roquefortii* diisolasi dari *Blue cheese* komersial. *Whey* yang digunakan sebagai bahan pengendap protein susu kedelai diambil dari pabrik tahu di wilayah Cibuntu, Bandung.

Semua bahan kimia yang digunakan berderajat *reagent*: agar bakto (Merck), sukrosa, NaCl (Merck), asam piruvat (Merck), alpha-ketoglutarat (Merck), dietil eter (Merck), H₂SO₄ (Merck), HCl (Merck), K₂SO₄ (Merck), Selenium (reagent mixture, Merck), Na₂S₂O₃.5H₂O p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), metil merah, metil biru, H₂BO₃ (Merck), indikator universal (Merck).

Pembuatan Keju Tahu Keju tahu dibuat dengan metode seperti yang dijelaskan oleh H. Lina (2003), L. dan N. Qomariyah (2005)

Pengambilan Sub Sampel

Pengambilan sub sampel dilakukan di dalam *laminair flow cabinet* dan sub sampel dibekukan disimpan pada -20 °C hingga waktu analisa.

Analisa kadar lemak. Kadar lemak ditentukan secara gravimetri setelah ekstraksi secara kontinu dalam eter.

Analisa kadar protein. Protein ditentukan dengan metoda Kjeldahl dengan faktor koreksi sama dengan 6,25.

Analisa Organoleptik. Analisa dilakukan dengan metode *Hedonic Scale*. Sampel keju dibandingkan dengan keju yang telah ada di pasaran yaitu 4 jenis keju komersial: keju biru (*blue cheese*), keju brie (*brie cheese*), keju gouda (*gouda cheese*), dan keju lunak dengan perisa lada hitam (*black pepper cheese*). Sampel disajikan secara homogen kepada 35 orang panelis tidak terlatih, terdiri atas 18 orang pria dan 17 orang wanita penduduk kecamatan Coblong, Bandung. Sampel disajikan acak dengan memberi kode tertentu. Hasil penilaian dinyatakan dalam skala hedonik dari nilai 1 (tidak suka), 2 (agak tidak suka), 3 (biasa / agak suka), 4 (suka), dan 5 (sangat suka) selanjutnya ditransformasi menjadi skala numerik dengan angka naik menurut tingkat kesukaan dan dilakukan analisa statistik terhadap skala numerik tersebut (p=0.05).

3. Hasil dan Pembahasan

Analisa kadar protein dan kadar lemak

Dalam penelitian ini kapang *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Pencillium roquefortii* dan kombinasinya digunakan untuk menginokulasi tahu. Penggunaan kapang yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kandungan protein dan lemak tahu.

Tabel 1 menunjukkan data hasil analisis keju tahu dengan berbagai kapang, dibandingkan dengan keju komersial. Data pada table itu menunjukkan bahwa kehadiran kapang akan menyebabkan kenaikan kandungan protein dan menurunkan kandungan lemak tahu (kecuali yang di fermentasi oleh *P.roquefortii*). Naiknya kandungan protein ini bisa berasal dari kehadiran kapang itu atau terjadi sintesis protein selama proses fermentasi. Sedangkan penurunan kadar lemak menunjukkan adanya aktivitas degradasi lipid tahu. Untuk memastikan dugaan ini, analisis terhadap protein dan lemak dilakukan lagi untuk sampel yang berumur 3 minggu. Tabel 2 dan 3 menunjukkan bahwa selama proses fermentasi berlangsung, terjadi sintesis protein dan degradasi lemak. Sintesis protein menghasilkan kenaikan kandungan protein antara 5%-12%, sedangkan degradasi lemak dalam waktu 3 minggu menurunkan kadar lemak antara 30%-90% Kandungan karbohidrat yang rendah dari

tahu mengkondisikan mikroba untuk menggunakan kandungan lemak tahu sebagai sumber energi.

Tabel 1 Pengaruh berbagai kapang terhadap kandungan protein dan lemak tahu terfermen-tasi

kapang yang digunakan	[protein] (%)	[lemak] (%)
Kontrol	18,503±0,093	3,545±0,022
<i>R. oligosporus</i>	22,090±0,253	3,195±0,040
<i>A. niger</i>	22,410 ± 0,130	0,456 ± 0,012
<i>P. roquefortii</i>	22,150±0,442	5,820±0,040
<i>R. oligosporus</i> + <i>P roquefortii</i>	23,405±2,368	2,306±0,075
<i>A. niger</i> + <i>P. roquefortii</i>	22,45 ± 0,12	0,442 ± 0,015
Keju komersial:		
Soft chees berperisa merica	5,50	10,37
Brie	12,10	20,07
Blue	20,36	4,54
Gouda	23,73	28,46

Data di atas berasal dari tahu yang terfermentasi selama 4 hari. Data menyatakan nilai rata ± simpangan baku.

Piruvat dan asam a-ketoglutarat merupakan senyawa intermediet dalam jalur glikolisis dan siklus asam trikarboksilat. Degradasi lipid dipengaruhi oleh konsentrasi piruvat di dalam sel. Data percobaan pengaruh penambahan piruvat dan asam a-keto glutarat dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 2 Pengaruh lama inkubasi terhadap kandungan protein keju.

kapang yang digunakan	[protein] (%)	
	hari ke-4	minggu ke-3
<i>R. oligosporus</i>	22,090±0,253	23,275±0,158
<i>A. niger</i>	22,410 ± 0,130	t.d
<i>P. roquefortii</i>	22,150±0,442	23,330±1,389
<i>R. oligosporus</i> + <i>P roquefortii</i>	23,405±2,368	26,365±0,916
<i>A. niger</i> + <i>P. roquefortii</i>	22,45 ± 0,12	t.d

t.d = tidak ditentukan

Tabel 4 menunjukkan bahwa penambahan asam piruvat maupun alpha-ketoglutarat menunjukkan pengaruh secara nyata pada kadar protein

dan lemak keju tahu pada masa *aging*. Keju tahu dengan penambahan asam piruvat (AP) menunjukkan penurunan kadar protein pada masa *aging* hingga akhir bulan ke-5, sedang keju tahu dengan penambahan alpha-ketoglutarat (KG) juga menunjukkan penurunan kadar protein tetapi pada akhir bulan ke-5 *aging* kadar proteinnya ditemukan kembali meningkat. Dikaitkan dengan sintesis dan degradasi asam amino yang mempengaruhi kadar protein dalam sampel, dapat dikatakan bahwa penambahan asam piruvat memicu sintesis asam amino pada keju tahu pada masa *aging* sedangkan penambahan alpha-ketoglutarat memicu degradasi asam amino pada masa *aging*.

Tabel 3 Pengaruh lama inkubasi terhadap kandungan lemak keju.

kapang yang digunakan	[lemak] (%)	
	hari ke-4	minggu ke-3
<i>R. oligosporus</i>	3,195±0,040	0,350±0,004
<i>A. niger</i>	0,456 ± 0,012	t.d
<i>P. roquefortii</i>	5,820±0,040	1,785±0,014
<i>R. oligosporus</i> + <i>P roquefortii</i>	2,306±0,075	1,600±0,009
<i>A. niger</i> + <i>P. roquefortii</i>	0,442 ± 0,015	t.d

t.d = tidak ditentukan

Tabel 4 Pengaruh penambahan asam piruvat dan asam α-keto glutarat pada kandungan protein dan lemak keju

Umur keju	Kadar Protein (%)		Kadar Lemak (%)	
	AP	KG	AP	KG
4 hari	18,24	16,85	3,99	3,66
1 bulan	17,77	15,06	3,20	3,52
2 bulan	16,33	14,62	3,07	3,50
5 bulan	15,68	18,79	8,67	6,35

AP= asam piruvat, KG= asam α-keto glutarat

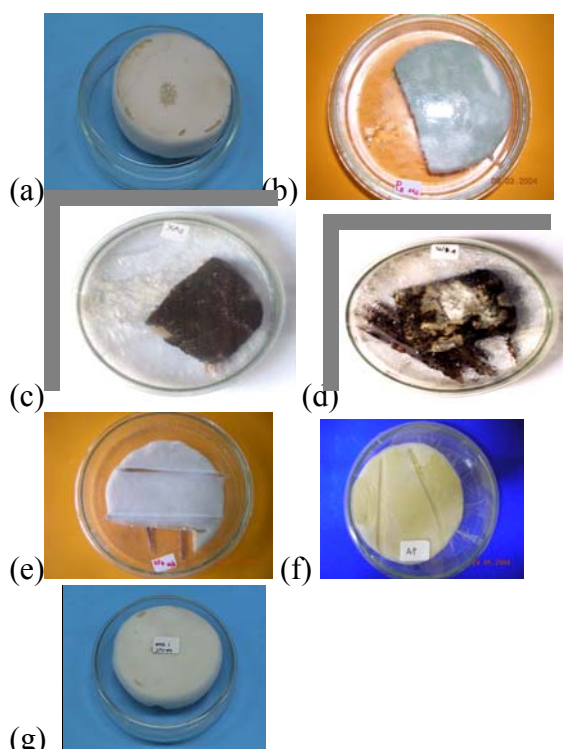
Pengaruh penambahan asam piruvat dan α-ketoglutarat memberikan kecenderungan yang sama, yaitu menurun selama masa inkubasi dan masa pemeraman hingga 2 bulan dan ditemukan meningkat kembali di akhir bulan ke 5 pemeraman. Dari hasil ini tampak bahwa penambahan asam piruvat maupun alpha-ketoglutarat juga mempengaruhi metabolisme lemak pada keju tahu oleh *R. oligosporus*. Dibandingkan dengan keju komersial,

kandungan protein keju tahu yang dihasilkan tidak jauh berbeda, sedangkan kadar lemaknya jauh lebih rendah dari pada keju komersial berbahan dasar susu.

Analisa organoleptik

Tekstur dan kesan mata keju tahu

Kapang yang digunakan tumbuh subur pada permukaan keju, hal ini mempengaruhi penampakan keju yang dihasilkan. Gambar 1 menunjukkan penampakan/kesan mata berbagai keju dengan berbagai variasi inokulum.



Gambar 1 Penampakan keju tahu dengan berbagai perlakuan

Keju tahu yang diinokulasi dengan (a) *R. oligosporus* (b) *P. Rouquefortii* (c) *A. niger* (d) Gabungan *A. niger* & *P. Rouquefortii* (e) Gabungan *R. Oligosporus* dan *P. Rouquefortii*, (f) Keju (a) dengan penambahan asam piruvat (g) Keju (a) dengan penambahan α -keto glutarat.

Warna keju yang dihasilkan bergantung pada kapang yang digunakan, akibat pertumbuhan spora dari kapang yang digunakan. Dari berbagai kultur yang digunakan, keju yang dihasilkan dengan fermentasi *Aspergillus niger* agak tidak memberi kesan yang menarik. Karena itu uji rasa tidak dilakukan terhadap keju dengan perlakuan *A. niger*.

Selama masa *aging*, penampakan permukaan keju tahu tidak mengalami perubahan yang menunjukkan pertumbuhan miselium yang sangat lambat pada masa ini. Tekstur bagian dalam keju tahu berangsur-angsur menjadi makin lunak selama proses *aging* berlangsung.

Uji cita rasa.

Hasil uji rasa dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Hasil uji rasa berbagai umur keju dan berbagai perlakuan

Sampel	Selang	Tingkat kesukaan
<i>P. roquefortii</i> , umur 3 minggu	1,77 < μ < 2,51	Agak suka
<i>R. oligosporus</i> + <i>P. roquefortii</i> , umur 3 minggu	2,26 < μ < 3,09	Agak suka
<i>R. oligosporus</i> , umur 3 minggu	1,76 < μ < 2,48	Agak tidak suka
<i>R. oligosporus</i> , umur 2 bulan	1,30 < μ < 2,07	Tidak suka
<i>R. oligosporus</i> , umur 5 bulan	1,90 < μ < 2,68	Agak tidak suka
<i>R. oligosporus</i> + asam piruvat, umur 2 bulan	1,64 < μ < 2,54	Agak tidak suka
<i>R. oligosporus</i> + asam piruvat, umur 5 bulan	1,84 < μ < 2,56	Agak tidak suka
<i>R. oligosporus</i> + α -ketoglutarat, umur 2 bulan	1,44 < μ < 2,10	Tidak suka
<i>R. oligosporus</i> + α -ketoglutarat, umur 5 bulan	1,67 < μ < 2,28	Agak tidak suka
Keju komersial:		
Soft chees berperisa merica	1,60 < μ < 3,04	Agak tidak suka
Brie	2,33 < μ < 3,25	Agak suka
Blue	1,95 < μ < 3,00	Agak tidak suka
Gouda	2,48 < μ < 3,53	Agak suka

Dari data pada tabel tersebut, keju dengan perlakuan kombinasi kapang *R. Oligosporus* dan *P. roquefortii* berumur 3 minggu mendapatkan skor tertinggi (2,26 < μ < 3,09), dengan tingkat kesukaan ‘agak suka’, mirip dengan skor yang dimiliki oleh keju komersial Brie cheese dan Gouda cheese.

Keju dengan perlakuan lain, umumnya menunjukkan makin bertambahnya umur keju,

skor kesukaan meningkat. Keju yang berumur 2 bulan serta yang diberi tambahan metabolit, memiliki derajat kesukaan yang mirip dengan keju lunak berperisa merica, sedangkan keju yang berumur 5 bulan memiliki skor penilaian yang mirip dengan keju komersial blue cheese.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan: perubahan tahu menjadi keju dapat meningkatkan kadar protein dan menurunkan kadar lemak. Perubahan keduanya cukup berarti, sehingga dari nilai gizi, perubahan tahu menjadi keju tahu memiliki nilai gizi yang lebih baik.

Keju yang dihasilkan dengan berbagai perlakuan di atas, umumnya memberi kesan mata yang dapat diterima, kecuali oleh *A.niger*. Umumnya panelis memberikan penilaian yang makin tinggi dengan bertambahnya umur keju.

Penilaian yang .diberikan mirip dengan keju komersial berbahan dasar susu..

5. Daftar Pustaka

Ariani S.R.D., 1997, Pembuatan Keju Kedelai yang Mengandung Faktor-2 sebagai Alternatif Pengembangan Hasil Olah Pangan dari Tahu. Tesis, Departemen Kimia, ITB.

Lina, Hesti, 2003, Pembuatan Keju Tahu yang Mengandung Faktor-2 Menggunakan Kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. Skripsi. Departemen Kimia, ITB.

Qomaiyah, Nurul, 2004, Pembuatan Keju Tahu yang Mengandung 6.7.4'-trihidroksiisoflavon Menggunakan Kapang *Rhizopus oligosporus* dan *Penicillium roquefortii*. Skripsi. Departemen Kimia, ITB.

Ur-Rehman, Shakeel and Patrick F. Fox, 2002, Effect of Added α -ketoglutaric acid, Pyruvic Acid or Pyridoxal Phosphate on Proteolysis and Quality of Cheddar Cheese, *Food Chemistry*, **76**, 21-26.

Optimasi produksi enzim glukosa oksidase dari *Aspergillus niger* L 51 indigenus

Firman AP

Laboratorium Teknologi Bioproses
Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang
Tlp (0411) 585365, 585367, Fax (0411) 586043
e-mail : Firman-AP@yahoo.com

Abstrak

Enzim glukosa oksidase (β -D-glukosa : oksigen 1-oksidoreduktase EC 1.1.3.4) mengkatalisis oksidasi β -D-glukosa menjadi asam glukonat dan peroksida. Umumnya preparat enzim glukosa oksidase digunakan dalam klinis untuk penentuan kadar glukosa darah. Telah dikaji pengaruh komposisi media, kecepatan aerasi dan agitasi terhadap produksi enzim glukosa oksidase dari *Aspergillus niger* L 51 indigenus dalam fermentasi skala labu kocok dan fermentor 2,5 L. Semua eksperimen dilakukan dalam suatu medium yang mengandung glukosa dan NaNO₃ sebagai sumber karbon dan nitrogen. Produksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas yang optimum dicapai pada konsentrasi glukosa 100 g/L dan NaNO₃ 6 g/L dengan waktu fermentasi 96 jam. Penambahan CaCO₃ dan ion logam Mg⁺² merangsang produksi enzim glukosa oksidase. Enzim glukosa oksidase yang diproduksi dalam media yang mengandung CaCO₃ 20 g/L dan MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L mempunyai aktivitas katalitik berturut turut sebesar 44,67 Unit/mL dan 32,94 Unit/mL, sedangkan produksi enzim glukosa oksidase dalam media tanpa penambahan CaCO₃ dan ion Mg⁺² aktivitasnya hanya sebesar 9,48 Unit/mL dan 29,44 Unit/mL. Pada kecepatan aerasi 1,0 vvm dan agitasi 300 rpm diproduksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 51,15 Unit/mL. Dari hasil-hasil penelitian tersebut di atas membuktikan bahwa isolat fungi *Aspergillus niger* L 51 indigenus memiliki potensi untuk dikomersialkan sebagai penghasil enzim glukosa oksidase.

Kata kunci: Aktivitas, *Aspergillus niger* L 51, enzim glukosa oksidase

1. Pendahuluan

Glukosa oksidase (GOD: β -D-glukosa O₂ 1-oksidoreduktase: EC.1.1.3.4) adalah termasuk kelompok enzim oksido-reduktase yang mengkatalisis oksidasi β -D-glukosa menjadi glukono- δ -lakton yang kemudian dengan adanya molekul air terhidrolisis menjadi asam glukonat dan peroksida. Enzim ini mempunyai keaktifan dan spesifisitas yang sangat tinggi terhadap β -D-glukosa. Enzim glukosa oksidase mempunyai keaktifan yang sangat tinggi terhadap β -D-glukosa sehingga enzim ini banyak digunakan untuk analisis glukosa darah di laboratorium klinik, industri dan pangan (Whitaker, 1972).

Penelitian melalui kerja sama bioteknologi ASEAN dan Australia pada tahun 1990-1992 dilaporkan bahwa isolat *Penicillium*

funiculosum 4072 aktif memproduksi glukosa oksidase ekstraselular dan asam glukonat. Glukosa oksidase dan asam glukonat/garamnya diproduksi simultan dari *Aspergillus niger* dan *Penicillium sp.* Sintesis glukosa oksidase dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen, ion logam tertentu dan pH media fermentasi (Petruccioli 1993). Peningkatan sintesis glukosa oksidase dan asam glukonat dapat dicapai melalui perbaikan galur mikroba secara mutagenesis (Fiedurek, 1997).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan isolat lokal *A niger* L 51 galur lokal aktif memproduksi enzim glukosa oksidase intraselular (*intraselular enzyme*). dan asam glukonat. Namun demikian optimasi produksi enzim tersebut hingga saat ini belum pernah

dilakukan (Firman dan Soedigdo, 1994).

Identifikasi mikroba penghasil enzim enzim glukosa oksidase dari fungi galur lokal juga telah pula dilaporkan. Beberapa isolat fungi yang diperoleh aktif memproduksi enzim enzim glukosa oksidase diantaranya: *Penicillium* sp-3, *Penicillium* sp-M, *Aspergillus niger* BT-1, *A. niger* BT-2, *A. niger* B-1, *A. niger* III, *A. niger* DDL, *A. niger* 2, *A. niger* 3 (Firman dan I.Nyoman P.A, 2002, Nur Umriana dan Firman, 2004). Pada penelitian ini telah dikaji pengaruh komposisi media, kecepatan aerasi dan agitasi terhadap produksi enzim glukosa oksidase dari *Aspergillus niger* L 51 indigenus dalam fermentasi skala labu kocok dan fermentor 2 L.

2. Percobaan

2.1 Produksi enzim glukosa oksidase pada berbagai konsentrasi glukosa dengan fermentasi skala labu kocok

Ke dalam labu erlemeyer 250 mL yang berisi 200 mL media pertumbuhan dengan komposisi terdiri dari (g/L): glukosa 40, pepton 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, KH_2PO_4 1, NaNO_3 5, dan pH media 7, diinokulasi dengan spora biakan *A. niger* L 51 kemudian dikocok pada kecepatan 150 rpm selama 48 jam pada suhu kamar. Selanjutnya 5% inokulum aktif dipindahkan ke dalam labu erlemeyer 500 mL yang berisi 200 mL media basal dengan variasi konsentrasi glukosa 40 g/L – 100 g/L (komposisi g/L : glukosa 40 – 100, pepton 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, KH_2PO_4 1, NaNO_3 5, CaCO_3 30 dan pH media 7) kemudian dikocok dengan shaker inkubator pada kecepatan 150 rpm suhu kamar selama 48 - 96 jam. Miselium yang telah tumbuh dipisahkan dengan cara filtrasi kemudian dicuci beberapa kali dengan air suling dan selanjutnya dilakukan isolasi enzim. Pengaruh konsentrasi NaNO_3 , ion logam (Fe dan Mg) dan CaCO_3 terhadap produksi enzim glukosa oksidase dilakukan dengan eksperimen yang sama. Uji aktivitas enzim glukosa oksidase dilakukan sebagai berikut: ke dalam kuvet diisi larutan glukosa 18%, bufer fosfat 0,05 M pH 6,0, aminoantipirin 0,01 M, fenol 0,02 M, peroksidase 1 unit dan enzim glukosa oksidase, lalu serapan hasil reaksi dibaca setiap menitnya pada panjang gelombang 510 nm (Firman dan Aryantha, 2002). Kadar protein enzim ditentukan menurut metode Lowry *et al.* (1951). Unit aktivitas adalah jumlah enzim yang dapat mengkatalisis pembentukan 1 mikromol peroksida pada kondisi uji.

2.2 Pengaruh kecepatan aerasi dan agitasi terhadap produksi enzim glukosa oksidase pada skala fermentor 2 L

Ke dalam labu erlemeyer 250 mL yang berisi 200 mL media pertumbuhan dengan komposisi terdiri dari (g/L): glukosa 40, pepton 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, KH_2PO_4 1, NaNO_3 4, dan pH media 7, diinokulasi dengan spora biakan *A. niger* L 51 kemudian dikocok pada kecepatan 150 rpm selama 48 jam pada suhu kamar. Selanjutnya 10% inokulum aktif dipindahkan ke dalam fermentor yang berisi 1,5 L media basal dengan komposisi (g/L) : glukosa 80, pepton 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01, KH_2PO_4 1, NaNO_3 5, CaCO_3 2, pH media 7, kemudian dikocok dengan kecepatan agitasi 200 rpm pada suhu 30 °C, kecepatan aerasi 0,5 – 1,5 vvm selama 72 jam. Pengaruh variasi kecepatan agitasi terhadap produksi enzim glukosa oksidase dilakukan dengan eksperimen yang sama.

3. Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan kajian optimasi produksi enzim glukosa oksidase skala labu kocok dan fermentor dari *A. niger* L 51. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas yang optimum (25,03 Unit/mL) berlangsung pada konsentrasi glukosa 100g/L (Tabel 1). Pada konsentrasi glukosa (40g/L) dengan waktu pertumbuhan 48 jam dihasilkan enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 14,08 Unit/mL sedangkan pada konsentrasi glukosa 60g/L dengan waktu pertumbuhan 48 jam dihasilkan enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 22,42 Unit/mL. Sementara itu hasil penelitian yang dilaporkan oleh Petruccioli dan Federici (1993) menunjukkan bahwa glukosa dan mannosia merupakan sumber karbon yang paling baik untuk produksi enzim glukosa oksidase dari *Penicillium variabile* P16. Pada konsentrasi glukosa 80 g/L diproduksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas yang optimum (5,37 Unit/mL).

Pengaruh garam NaNO_3 terhadap produksi enzim glukosa oksidase dapat dilihat pada Tabel 2. Pada konsentrasi NaNO_3 6 g/L diproduksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas tertinggi yaitu 33,62 Unit/mL. Aktivitas enzim glukosa oksidase yang rendah (28,66 Unit/mL) diproduksi pada konsentrasi NaNO_3 4g/L. Menurut Gorniak dan Kaczkowski (1973) penambahan NaNO_3 dalam

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi glukosa terhadap aktivitas enzim glukosa oksidase dari *A. niger* L51

Konsentrasi Glukosa (g/L)	Waktu Pertumbuhan (jam)	pH Media Setelah Pertumbuhan	Volume Enzim (mL)	Aktivitas enzim (Unit/mL)
40	48	5,5	8,0	14,08
60	48	5,5	8,9	22,42
60	72	5,3	8,0	20,78
80	72	5,2	8,0	24,08
100	96	5,2	8,0	25,30

Keterangan: Media tanpa MgSO₄.7H₂O, konsentrasi CaCO₃ 30 gram, kecepatan aerasi 150 rpm, suhu pertumbuhan 30°C.

Tabel 2. Pengaruh berbagai konsentrasi NaNO₃ terhadap aktivitas glukosa oksidase dari *A.niger* L51

NaNO ₃ (g/L)	Waktu Pertumbuhan (jam)	pH media setelah pertumbuhan	Volume Enzim (mL)	Aktivitas enzim (Unit/mL)
4	72	5,0	5,0	33,40
6	72	4,7	5,0	33,62
8	72	4,9	5,0	28,66
10	72	5,0	5,0	30,26

Keterangan: Media tanpa MgSO₄.7H₂O, konsentrasi CaCO₃ 30 gram, kecepatan aerasi 150 rpm, suhu pertumbuhan 30°C.

Tabel 3 Pengaruh ion logam (Mg dan Fe) terhadap aktivitas glukosa oksidase dari *A.niger* L 51

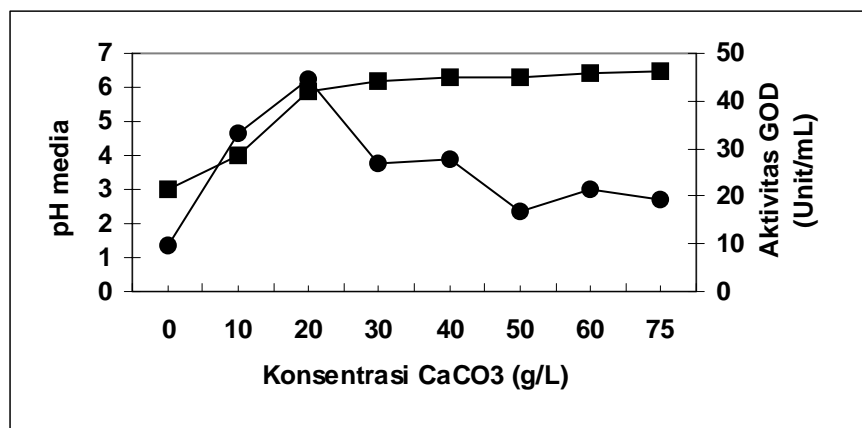
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	FeSO ₄ . 7H ₂ O (g/L)	pH Media Setelah Pertumbuhan	Volume Enzim (mL)	Aktivitas Enzim (Unit/mL)
MB	MB	6,0	7	32,42
0	0	4,5	7	29,44
0,5	0	5,6.	7	32,94
0	0,01	6,1	7	18,18
0	0,02	6,0	7	31,92
0,25	0,01	5,4	7	31,0

Keterangan: Komposisi media basal (MB) terdiri dari (g/L): glukosa 80, pepton 3, MgSO₄.7H₂O 0,5, FeSO₄.7H₂O 0,01, KH₂PO₄ 1, NaNO₃ 5, CaCO₃ 30 dan pH media 7, kecepatan aerasi 150 rpm, suhu pertumbuhan 30°C dan waktu fermentasi 72 jam.

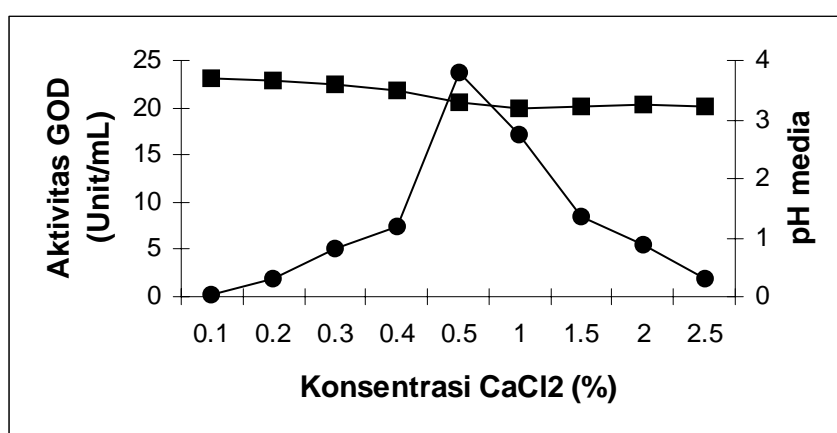
media pertumbuhan mengstimulasi pembentukan enzim glukosa oksidase.

Produksi enzim glukosa oksidase juga dipengaruhi oleh ion-ion logam tertentu. Pada Tabel 3 menunjukkan bahwa ion logam Mg⁺² mengaktifasi pembentukan enzim glukosa oksidase sedangkan ion Fe⁺² memberikan efek yang sebaliknya yaitu menghambat produksi enzim. Efek yang sama juga terjadi pada produksi enzim glukosa oksidase dari *Penicillium purpugenum* (Nakamatsu *et al.* 1975). Sebaliknya produksi enzim glukosa oksidase dari *Penicillium variabile* P16 diaktifasi oleh ion Fe⁺² sedangkan ion Mg⁺² menghambat produksi enzim glukosa oksidase (Nakamatsu *et al* 1975, Petruccioli and Fidericci, 1993).

Efek penambahan CaCO₃ dalam media pertumbuhan terhadap produksi enzim glukosa oksidase dapat dilihat pada Gambar 1. Pada konsentrasi CaCO₃ 20 g/L diproduksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas yang optimum (44,67 Unit/mL), sedangkan pada media pertumbuhan tanpa CaCO₃ diproduksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 9,48 Unit/mL. pH media selama produksi enzim glukosa oksidase turun dari pH awal 7 menjadi 3. Penambahan CaCO₃ ke dalam media pertumbuhan secara langsung terkait dengan perubahan pH dalam media selama produksi enzim glukosa oksidase. Hasil eksperimen lain menunjukkan bahwa enzim glukosa oksidase yang diproduksi dari *Aspergillus niger* L 51 dalam media yang mengandung CaCl₂ mempunyai aktivitas yang rendah, hal ini



Gambar 1. Pengaruh CaCO₃ dalam media pertumbuhan terhadap produksi enzim glukosa oksidase. Aktivitas enzim (●) pH media (■)



Gambar 2. Pengaruh CaCl₂ dalam media pertumbuhan terhadap produksi enzim glukosa oksidase. Aktivitas enzim (●) pH media (■)

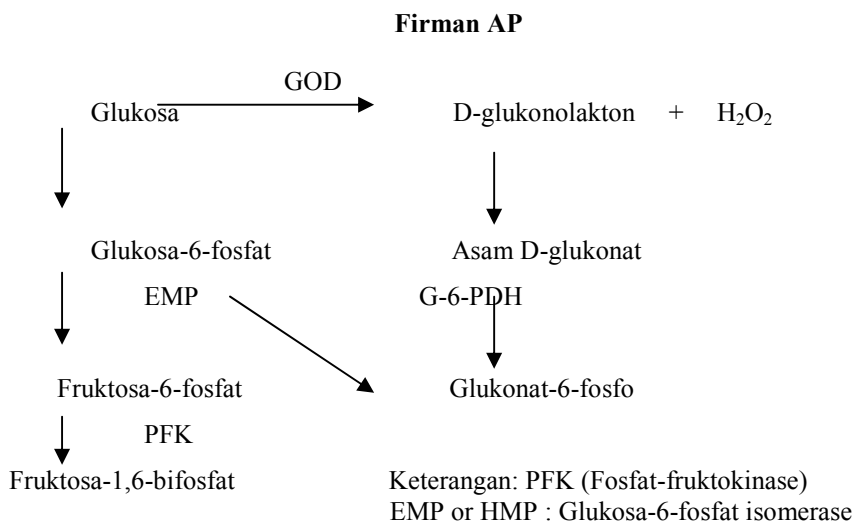
disebabkan ion klorida menghambat produksi enzim (Gambar 2) (Syafaa dan Firman, 2004).

Peningkatan aktivitas enzim glukosa oksidase disebabkan karena (1) CaCO₃ dapat mengimbangi/mempertahankan pH media selama pertumbuhan sehingga tidak terjadi penurunan pH secara drastis (2) induksi CaCO₃ disertai dengan pergeseran jalur metabolisme glukosa dari jalur glikolisis ke jalur oksidasi langsung glukosa menjadi D-glukono-lakton. Pada jalur ini sintesis enzim glukosa oksidase diinduksi untuk mengoksidasi D-glukosa menjadi D-glukonolakton. Hasil eksperimen lain (data tidak dilaporkan) menunjukkan bahwa konsentrasi asam glukonat yang terbentuk selama produksi enzim glukosa oksidase dalam media yang mengandung CaCO₃ lebih tinggi dibandingkan dengan media tanpa CaCO₃. Dengan demikian hasil eksperimen tersebut di atas memperkuat dugaan bahwa penambahan CaCO₃ menyebabkan pergeseran metabolisme glukosa

pada *A niger* dari jalur glikolisis ke jalur lain (oksidasi langsung D-glukosa menjadi asam glukonat) atau jalur pentosa fosfat (D-glukosa menjadi glukosa-6-fosfat kemudian menjadi glukonat-6-fosfat) seperti terlihat pada Gambar 3.

Produksi enzim glukosa oksidase skala fermentor dilakukan dengan variasi kecepatan aerasi (0,5 vvm – 1,5 vvm) dan agitasi (200 – 500 rpm) pada berbagai waktu pertumbuhan. Pada kecepatan aerasi 1,0 vvm dihasilkan enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 27,69 Unit/mL dan asam glukonat sebesar 16,17 (Tabel 4).

Jadi kondisi optimum produksi enzim glukosa oksidase adalah pada kecepatan aerasi 1,0 vvm. Hasil eksperimen pada Gambar 5 menunjukkan bahwa pada kecepatan agitasi 200 rpm dengan waktu pertumbuhan 24 jam dihasilkan enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 8,76 Unit/mL. Enzim glukosa oksidase dengan



Media tanpa CaCO₃

Media dengan CaCO₃

Gambar 3. Jalur metabolisme glukosa yang berkenaan dengan adanya CaCO₃ dan tanpa CaCO₃ dari *Aspergillus niger* (Liu *et al.*, 2001, Syafaa dan Firman, 2004)

Tabel 4. Pengaruh kecepatan aerasi (vvm) terhadap produksi glukosa oksidase dan asam glukonat

Kecepatan Aerasi (vvm)	pH Setelah Fermentasi	Aktivitas GOD (Unit/mL)
0,5	5,5	18,03
1,0	5,2	27,69
1,5	5,0	22,95

Keterangan: Waktu fermentasi 72 jam, kecepatan pengadukan 200 rpm dan suhu pertumbuhan 30°C

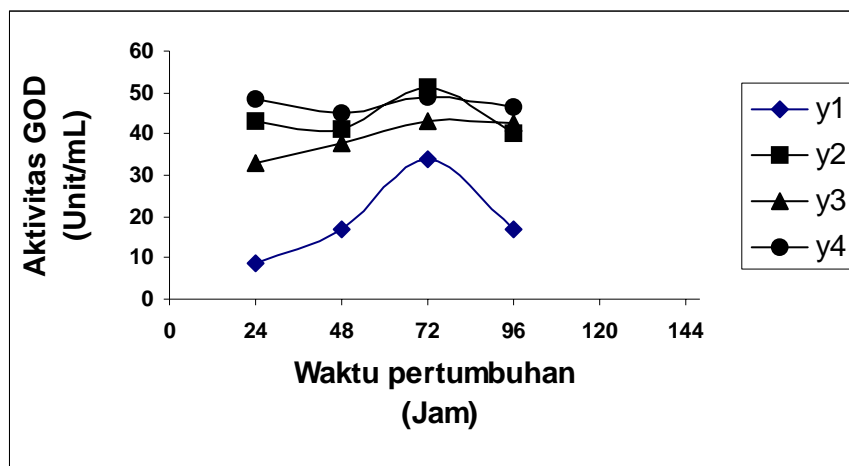
aktivitas yang tinggi (51,15 Unit/mL) berlangsung pada kecepatan agitasi 300 rpm dengan waktu pertumbuhan 72 jam.

4. Kesimpulan

- Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil

beberapa kesimpulan sebagai berikut:

- Konsentrasi glukosa yang optimum untuk produksi Enzim glukosa oksidase dengan aktivitas tinggi (24,08 Unit/mL) adalah 100 g/L dengan waktu pertumbuhan 96 jam, sedangkan



Gambar 5. Pengaruh kecepatan agitasi terhadap produksi enzim glukosa oksidase. Kecepatan agitasi 200 rpm (y1), 300 rpm (y2), 400 rpm (y3) dan 500 rpm (y4).

konsentrasi NaNO_3 yang optimum untuk produksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas tinggi (33,62 Unit/mL) adalah 6 g/L.

- Ion Mg^{+2} ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L) menstimulasi produksi enzim glukosa oksidase sedangkan ion Fe^{+2} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L) menghambat produksi enzim glukosa oksidase.
- Penambahan CaCO_3 20 g/L menginduksi produksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas tinggi (44,67 Unit/mL). Pada media tanpa CaCO_3 dihasilkan enzim glukosa oksidase dengan aktivitas 9,48 Unit/mL.
- Produksi enzim glukosa oksidase dengan aktivitas tinggi (51,15 Unit/mL) berlangsung pada kecepatan agitasi 300 rpm dengan kecepatan aerasi 1,0 vvm.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek RUT X.

6. Daftar Pustaka

Biotechnology in ASEAN, Asean-Australia Biotechnology Proyect. July, 1990 - June 30, 1992.

Fiedurek J., Gromnada A., (1997). Screening and mutagenesis of molds for improvement of simultaneous production of catalase and glucose oxidase. *Enzyme and Microbiol Technology*. **20**,344-347.

Firman., I Nyoman P.A., (2002). Eskplorasi fungi inferfecti galur lokal (Genus *Aspergillus* dan

Penicillium) penghasil enzim glukosa oksidase. Laporan Hasil Penelitian Dasar, Lembaga Penelitian Institut Teknologi Bandung.

Firman., Soedigdo P., (1994). Pembuatan preparat glukosa oksidase dari *A. niger* L 51 untuk pereaksi penentuan kadar glukosa. Thesis S-2 Program Pascasarjana ITB.

Gorniak H., and Kaczowski J., (1973). The influence of nitrogen source on the biosynthesis and properties of glucose oxidase in culture of *P. notatum*. Bulletin of the Academy of Polish Sciences. *Series Biology*. **21**, 571-576.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J., (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol Chem*. **193**, 265-275.

Liu J.Z., Huang Y.Y., Liu J., Weng L.P., and Ji L.N., (2001). Effect of metal ions on simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *A niger*. *Letter in Appl. Microbiol*. **32**, 16-19.

Nur Umriani dan Firman (2004). Isolasi dan karakterisasi enzim glukosa oksidase dari *A niger* BT-2 galur lokal. Skripsi Program S1 Jurusan Kimia FMIPA Unhas

Petruccioli M., and Fiderici F., (1993). Glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16: effect of medium composition. *J. Appl. Microbiol*. **75**, 369-372.

Syafaa dan Firman (2004). Pengaruh CaCO_3 dan CaCl_2 terhadap produksi enzim glukosa oksidase dari *A niger* L 51. Skripsi Program S1 Jurusan Kimia FMIPA Unhas.

Whitaker R.J., (1972). Principle of enzymology for the food science, Mergel Dekker Inc, New York. 561-567.

Assesment of River Water Quality Status By Using a New Developed Water Quality Index System

M. A. Fulazzaky and B. Machbub

1) Directorate General of Water Resources, Ministry of Public Works
Jl. Pattimura No. 20 Jakarta 12110, Indonesia; e-mail : fulazzaky@yahoo.com

2) Water Resources Research and Development Institute, Ministry of Public Works
Jl. Ir. H. Juanda No. 193 Bandung 40123; e-mail : b_machbub@bdg.centrin.net.id

Abstract

The assessment of river water pollution is usually conducted by a comparison between the effective water quality and the standards regulated by law. The water quality standards are fixed both on water utilization purposes and on consideration of water quality degradation. The water quality index is usually assigned through an evaluation of the water condition by classification into several categories. This paper elaborates a tool for water quality evaluation by the application of a software system to define the water quality index. The assignment of the index is fixed from index-1 to index-5 according to water degradation taking account of an indicated value of water quality parameter concentrations. Index-1 means a category of excellent quality of unpolluted water and index-5 is a category of very polluted water.

Around 150 water quality parameters of comparable nature and impact on environment are grouped into 15 alterations that are: temperature, color, suspended particles, oxidized organic matters, nitrogen matters, nitrate, phosphorous matters, mineralization, acidification, inorganic micro-pollutant for raw water, inorganic micro-pollutant for bryophytes, pesticide for raw water, organic micro-pollutant non-pesticides for raw water, micro-organisms, and phytoplankton. Index determination consists of 3 stages: - starting with a selection of the biggest limit value of parameter in each alteration according to the index classification, - following by a selection of the highest index of alteration, and finally, terminating by fixation of the water quality index.

The application of the index system has been conducted to 2 rivers, the Citarum River in West Java and the Brantas River in East Java. The assessment of the water quality for the Citarum River was based on data from 10 sampling point locations and by evaluating 33 parameters, which were monitored in the dry season period in 2003. The result indicates the index-5 for the upstream region of the Citarum River due to high concentration of suspended particles and phosphorous. The index-5 always was still present along the middle stream, due to receiving the effluents coming from domestic and industrial wastes, indicated by high concentrations of organic matters and bacteria indicators. After the water passed the 3 cascade reservoirs (Saguling, Cirata and Jatiluhur), the index-3 was found, and in the downstream region of the Citarum River close to the sea the index-5 was observed again, due to contamination by industrial and domestic wastes. The assessment of the water quality for the Brantas River was done for 5 sampling points selected from 51 monthly monitoring locations of data collection in 2003 and by evaluating 22 to 28 parameters. The data were selected by application of the rule of 90% and the result shows the index-5 for water quality along of the Brantas River due to high concentration of suspended particles, phosphorous and inorganic micro-pollutants.

Key words: evaluation, index, pollution, water quality.

1. Introduction

Water resources management entails the development of appropriate quantities of water with an adequate quality. The deterioration of water quality reduces the usability of the resources for down-stream stakeholders. The government of the Republic of Indonesia, in the year of 2001, under the water resources sector

reformation framework has been issued the government regulation number 82 on water quality management and pollution control, as a reference especially for the water managers who working in the several related institutions of the national, provincial and river basin levels. This regulation consists the role of the institutions for the central as well the regional

governments, the technical arrangement for water quality management and pollution control as well as the classification of national water quality criteria, and for supporting the real operational in field of this government regulation needs to be more detail translated by each provincial governments through their regional regulations. The water quality index system is developed to answer the desire of all regions in Indonesia on the classification of in-stream water quality degradation degree by using a national standard mechanism and than of course can be followed up by each provincial government taking account as a tool for assessment of the status of water quality regarding the process of preparation the priority of action plan on water quality management and pollution control as well as the formulation of the regional regulation on water quality standards for each river segment areas located in their administrative regions.

According to the results of field inventory for some cases indicating that the high water pollution in the rivers and lakes due to the high increasing of social and economic activities and industrial developments. Although the impact of economic development in the regions produces some unusable materials such as waste solids and wastewater as well as industrial waste gases. The industrial and domestic wastewaters are really, after or before passing in a wastewater treatment plant, ejected to the river and lakes. Actually, the sources and types of pollutant are not correctly monitored yet and of course regarding for this reason it really needs to be developed a comprehensive method for evaluation of the water pollution degree. Ahead, this method could be considered to following up by the regional government maybe in issuing the regional government regulation or the governor decree. A new method of water quality assessment system have been developed in 1999 by the Agence de l'eau Loire- Bretagne, Oudin *at. al* (1999) and, after an evaluating to the method on considering of the specific country climate and of the habitually water quality parameters monitoring, it can be appropriate widely implemented in Indonesia taking account of some modifications needed, Fulazzaky (2000). Because the system consists a comprehensive classification of the water quality parameters, including the complex and rigorous alterations such as the pesticides and inorganic micro-

pollutant matters as well as the organic micro-pollutant non-pesticides that it really has not been considered under the assessment framework mechanism of water quality in Indonesia. This method will be predictable adapted for advances in space science and technology. And, by using the similar method, in 2003 the Directorate General of Water Resources have been developed the water quality assessment system and implemented for two in-stream water rivers in Indonesia, Rapport of internal study (2003).

2. Methodology and Architecture of the Water Quality Index System

Several steps on assessment of the water quality index system

The several steps are commonly used to assess the classification of water quality degradation degree, called the evaluation system of water quality index, as follows:

- classifying the water quality parameters into 15 alterations which have a comparable nature and impact on environment;
- evaluating the appropriate limit value for each water quality parameters into 5 index classes respectively representing by blue, green, yellow, orange, and red for excellent quality of unpolluted water, good water quality, moderate water quality, bad water quality, and unusable water quality of very polluted water;
- formulating the water quality index classes for all parameters of each alterations with mentioning the range of 0 to 20 for index-1, of > 20 to 40 for index-2, of > 40 to 60 for index-3, of > 60 to 80 for index-4, and of > 80 to 100 for index-5;
- fixing the water quality index by evaluating of all parameters in each alterations and choice of the very bad value of the water quality parameter as the representative for the index of alteration and following by choice of the very bad alteration as the representative for the water quality index.

Classification of the water quality parameters into 15 alterations

The in-stream water quality of a river segment area is designated by the monitored value of the

Table 1. Example, the oxidized organic matter parameters of water quality index classification

Alteration	Parameter	Unity	Limit value of parameter for index classification				
			Index-1	Index-2	Index-3	Index-4	Index-5
Oxidized organic matters	Dissolved oxygen	mg/l O ₂	8	6	4	3	< 3
	Oxygen saturation	% O ₂	90	70	50	30	< 30
	COD	mg/l O ₂	20	30	40	80	> 80
	BOD	mg/l O ₂	3	6	10	25	> 25
	DOC	mg/l C	5	7	10	12	> 12
	NH ₄ ⁺	mg/l NH ₄	0.5	1.5	2.8	4	> 4
	NTK	mg/l N	1	2	4	6	> 6

Note: COD as chemical oxygen demands; BOD as biochemical oxygen demands; DOC as dissolved organic carbons, NH₄⁺ as ammonium, and NTK as nitrogen total Kjeldahl.

water quality parameters, although for generalizing the water quality status in the common sense it is necessary classified around of the 150 parameters of comparable nature and impact on environment into 15 alterations, as following: 1. temperature; 2. color; 3. suspended particles; 4. oxidized organic matters; 5. nitrogen matters; 6. nitrate; 7. phosphorous matters; 8. mineralization; 9. acidification; 10. inorganic micro-pollutant for raw water; 11. inorganic micro-pollutant for bryophytes; 12. pesticides for raw water; 13. organic micro-pollutant non-pesticides for raw water; 14. micro-organisms; and 15. phytoplankton.

Category of water quality index according the water quality degradation degree

The assignment of the index of water quality is fixed by 5 categories, as showing in Table 1 for oxidized organic matters for instance, according to the water quality degradation degree taking account of an indicated limit value of the water quality parameters selected from 15 alterations, as following: the index-1 means a category of excellent quality of unpolluted in-stream water and representing by blue color; the index-2 assigns a category of good quality of in-stream water and representing by green; the index-3 indicates a category of moderate quality of in-stream water and representing by yellow; the index-4 assigns a category of bad quality of in-stream water and representing by orange; and the index-5 means a category of unusable quality of very

polluted in-stream water and representing by red.

Method for determination of the water quality index

Every parameter around of 150 water quality parameters that including in the 15 alterations has a limit value for each index category, for evaluating the result of water quality monitoring can be started by selecting one of the water quality parameter of each alterations that having the highest index category as the representative of the parameters and than to be continued by comparing the index among of the alterations and selecting one of the alteration that having the highest index category as the representative of the alterations and finally fixing the highest index as the water quality index for the selected location of sampling point of the in-stream water of rivers or lakes.

3. Study on temperature as a sensitive parameter to assess the water quality index for the tropical country

In the literature, Oudin *at. al* (1999), indicated that for the temperature parameter categories, if the value of temperature is below of 21.5 °C the water quality of in-stream water categorized by index-1, and than successively following by limit values of the temperature of > 21.5 to 23.5 °C for index-2; of > 23.5 to 25 °C for index-3; of > 25 to 28 °C for index-4; and finally for the value of temperature over of 28 °C categorized by index-5. This category is not suitable applied to the tropical country like Indonesia regarding the risk of classification

the natural water quality in several regions into a very bad category of the index-5 and the reality in field showed that the in-stream water indicated by the temperature over than 28 °C is also appropriate for several uses as well for irrigation and also for natural biology functions. According to the same literature, it seems that the deviation of temperature monitored at the down-stream of an ejected pollutant location is resulted by deducting the effective temperature measured at the down-stream to the temperature at the up-stream, and the value of temperature's deviation can be used to representing the temperature parameter. Although it needs for a sampling point location to be compared by the historical temperature data indicating that it is more applicable used for the tropical climate country such as for Indonesia. The water quality index category indicated by the temperature's deviation is for the value of temperature's deviation bellow of 1.5 °C indicated by index-1 and successively following by the limit value of temperature's deviation of > 1.5 to 2 °C indicated for index-2; of > 2 to 2.5 °C for index-3; of > 2.5 to 3 °C for index-4; and for the deviation value of temperature over of 3 °C is categorized by index-5. Of course, in the case of this study the application of temperature's deviation is more realistic and adaptable to be selected.

4. Implementation of the water quality index system for two selected rivers in Indonesia

Data selection from two important rivers

In implementation of the water quality index system for assessment of the in-stream water has been selected for two important rivers, due to the reason of the economic development purposes in Indonesia, located in Java island, that is the Citarum River in West Java and the Brantas River in East Java, where in both the water resources is managed by the Jasa Tirta Public Corporation and the water quality monitoring has been routinely programmed on their annual budget activities. Among the data collection of the two rivers 10 locations of sampling point of the Citarum River monitored on August 2003 and 5 locations selected from 51 sampling point locations of the Brantas River monitored along the period of time series of 9 months of the year of 2003 were applied for running the system.

Determination of water quality index for the Citarum River

The 10 sampling point locations for the Citarum river is applied for running the model by using the data monitored on August 2003, where 3 sampling points (Curug, Walahar and Tanjungpura) located in the down-stream and 7 other locations (Wangisagara, Majalaya, Sapan, Cijeruk, Dayeuhkolot, Brujul, and Nanjung) located in the up-stream of the 3 cascade reservoirs (Saguling, Cirata and Jatiluhur) as showed in Figure 1.

The application of model test, for instance, to be selected for the Nanjung sampling point located at the up-stream region of the Citarum river taking account of the river segment received a very high pollutant coming from industrial and domestic wastewaters of the Bandung city and Bandung district areas, and the result of evaluation just for oxidized organic matters as showing in Table 2 indicated the index-5 of water quality status. The result of evaluation for the 33 water quality parameters which classified into 13 alterations, where two alterations: pesticides and micro-pollutant organic non-pesticides were not be evaluated due to absent of data, showed that the index-5 was founded for suspended particles, oxidized organic matters, and phosphorous alterations indicated by high values of suspended solids, dissolved oxygen, biochemical oxygen demands, total phosphorous, and soluble phosphorous as well as for inorganic micro-pollutant for raw water and micro-organisms. The impact of pollution is really mentioned in field by appearing the eutrophicated phenomena in the Saguling reservoir located in the down-stream of the Nanjung station in where has been installed a biggest hydropower in Indonesia.

The analysis of 10 sampling point locations along the Citarum River by evaluating the 33 water quality parameters showed in Table 3, with application of the similar method such as for evaluation of the water quality index at the Nanjung location given the values of all index of 13 alterations for each locations as well as the water quality index of the in-stream water quality. All locations have the excellent quality of temperature and nitrate but it was very polluted phosphorous matters except at the Bendung Curug, Bendung Walahar and

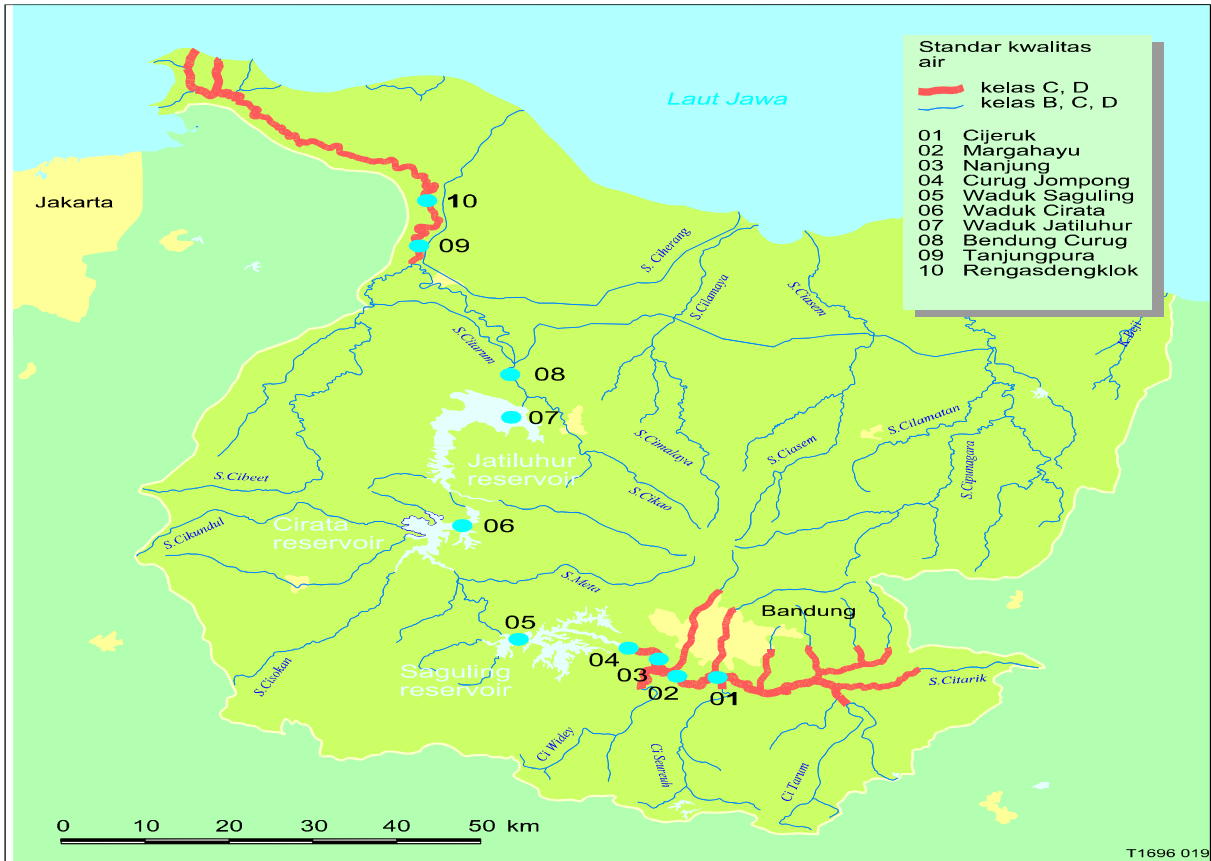


Figure 1. Sampling point locations along the Citarum River

Tanjungpura sampling points were located at the down-stream of the 3 cascade reservoirs.

According to the result of analysis for water quality degradation status as shown in Table 3, the in-stream water of the Citarum River from up-stream to down-stream is very polluted water that is indicated by the index-5 except the Bendung Curug and Bendung Walahar locations which are indicated by the index-3. The moderate water quality for some segments of the Citarum River as mentioned by the index-3 at the two locations, although a lot of industries and urban areas are founded at the up-stream region, it is probably indicated by the presenting of the self-purification phenomena for in-stream water of the Citarum due to the presence

of the 3 cascade reservoirs: the Saguling, Cirata and Jatiluhur, where located in the up-stream of the sampling locations. The polluted parameters of the Citarum River were exactly dominated by the phosphorous matters, oxidized organic matters, micro-organisms as well as by the suspended particles.

Determination of water quality index for the Brantas river

The implementation of the water quality index system for in-stream water of the Brantas River to be done after passed the process of selection of the data via the rule of 90%, Oudin *at. al* (1999), $F = (i-0.5)/N$ or $i = 0.9 \times N + 0.5$, where: *i* is the number of applicable monitored water sample; *N* is the number of monitored

Table 2. Example, water quality index evaluation for the oxidized organic matters

Water quality parameter of oxidized organic matters	Unity	Value	Class of parameter index	Water quality index
Dissolved oxygen	mg/l O ₂	0	5	5
COD	mg/l O ₂	75	4	
BOD	mg/l O ₂	30	5	
NH ₄ ⁺	mg/l O ₂	0.955	2	

Remarks : location Nanjung; date of monitoring August 21, 2003

Table 3. Result of water quality index evaluation for the Citarum River

Types of alteration	Index of alteration									
	01a	01b	01c	01	03a	03b	03	08	09a	09
Temperature	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Color	2	2	4	3	3	3	4	2	3	2
Suspended particles	5	4	5	5	3	4	5	2	2	3
Oxidized organic matters	2	5	5	5	4	5	5	2	2	2
Nitrogen matters	3	1	3	3	3	3	3	3	1	3
Nitrate	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phosphorous matters	5	5	5	5	5	5	5	2	2	3
Mineralization	3	1	3	2	1	1	2	1	1	2
Asidification	1	1	4	1	1	1	3	1	1	1
Inorganic micro-pollutant for raw water	3	3	4	3	4	4	5	1	1	1
Inorganic micro-pollutant for bryophytes	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1
Pesticides for raw water										
Organic micro-pollutant non-pesticides for raw water										
Micro-organisms	3	5	5	5	5	5	5	3	3	5
Phytoplankton	1	1	4	1	1	1	3	1	1	1
Water quality index	5	5	5	5	5	5	5	3	3	5
Number of parameter analysis	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

Remarks: 01a Wangisagara, 01b Majalaya, 01c Sapan, 01 Cijeruk, 03a Dayeuhkolot, 03b Brujul, 03 Nanjung, 08 Bendung Curug, 09a Bendung Walahar, 09 Tanjungpura.

water sample; and $F = 0.9$ is percentile of applied data. It can be really used this rule, of course, by considering one of the major activities for the water resources management in the Brantas River basin that the Jasa Tirta 1 Public Corporation has been frequently

monitored water quality along the Brantas River both by manual collected water sample for the 51 stations and by automatic real time monitoring system for the 23 stations as showed in Figure 2.

The evaluation of the 22 to 28 parameters is

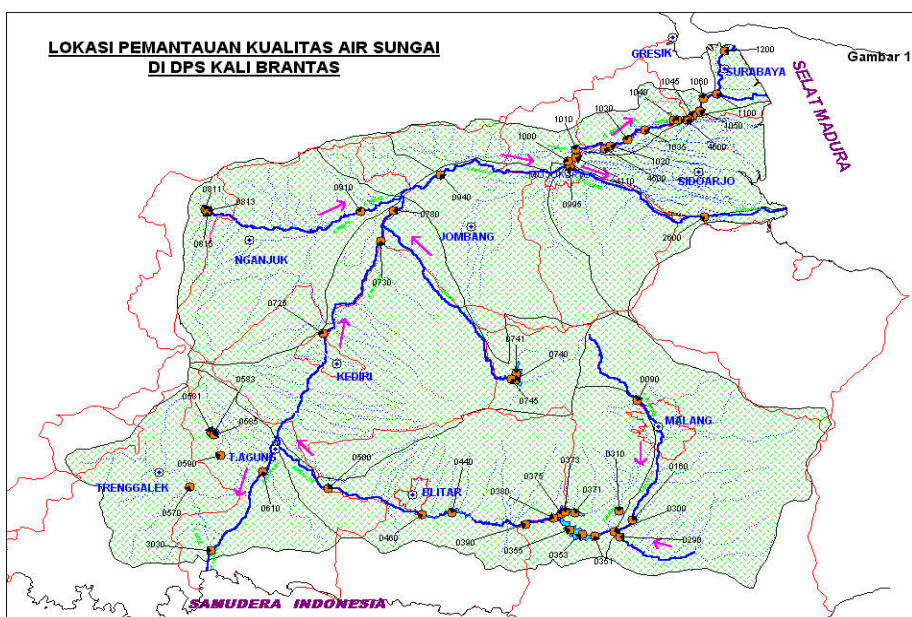


Figure 2. Sampling point locations along the Brantas River

Table 4. Result of water quality index evaluation for the Brantas River

Types of alteration	Number of applicable result and index of alteration									
	0160		0940		1020		1100		2600	
	i	index	N	index	N	index	N	index	N	index
Temperature	9	1	8	1	9	1	10	1	9	1
Color										
Suspended particles	9	5	3	5	9	5	10	5	9	5
Oxidized organic matters	9	4	8	4	9	4	10	5	9	5
Nitrogen matters	9	3	8	3	9	5	10	3	9	3
Nitrate	9	3	7	2	9	2	10	2	8	2
Phosphorous matters	9	4	8	5	9	4	10	5	9	5
Mineralization	9	1	8	1	9	1	10	1	9	2
Asidification	9	1	8	1	9	1	10	1	9	1
Inorganic micro-pollutant for raw water	9	5	1	5	7	5	8	5	7	5
Inorganic micro-pollutant for bryophytes	9	4	5	1	7	3	10	1	7	3
Pesticides for raw water										
Organic micro-pollutant non-pesticides for raw water										
Micro-organisms										
Phytoplankton	9	2	8	3	9	3	10	2	9	4
Water quality index	5		5		5		5		5	
Number of parameter analysis	28		22		25		26		25	

Location remarks: 0160 Kedung Pedaringan; 0940 Jembatan Ploso; 1020 Jembatan Pening; 1100 Ngagel; 2600 Jembatan Porong

classified into 11 alterations due to the absence of three alterations: color, pesticides for raw water and organic micro-pollutant non-pesticides for raw water as well as the micro-organisms under the annual water quality monitoring program as showed in Table 4. According to the result of the data analysis by implementing the water quality index system showing that the index-5 representing by suspended particles and inorganic micro-pollutant on raw water was founded for all selected locations along the Brantas River, at: the Kedung Paderingan, Ploso, Pening, Ngagel and Porong. The high concentration of suspended solids showing the progressively increasing of the rate of sediment transport in the river as a cumulative impact of land erosion due to deforestation and degradation of the watershed catchment area, since 1998, in the upper of the Brantas basin. The high concentration of copper and mercury in the stream of the Brantas River may be either

coming from industrial wastewater or from mountainous eruption sludge and so, of course, it is necessary to be followed up by a detail research program.

The index-4 of oxidized organic matters as well the phosphorous matters in the up-stream and middle stream of the Brantas River and also the index-5 in the down-stream indicating of polluted and very polluted water quality along the river due to high amount of direct or indirect ejected of the industrial wastewater and also stimulated by charging the direct ejected domestic wastewater coming from some households of several cities close the river.

5. Conclusion

The water quality index system as an indicator of water pollution can be widely used to assess the in-stream river water in Indonesia although the application of the system on the in-stream lake water must be evaluated more detail by studying the quality of water of each different

depths. The system needs to be modified according to the local climate of the country especially the sensitive parameters such as temperature.

The result of the water quality index system by implementing for 2 rivers: the Citarum and Brantas showing that in both the in-stream river water has been very high polluted. The result of this study is really supported by the other results of previous studies, of course, due to many cases of water pollution and land degradation in the river basin catchment areas. The parameters indicated a high and specific pollutant to be used as an indicator for selecting the priority of program for the water quality management and pollution control.

In considering the role of the Brantas River is very important to develop the social economic activities of the peoples in East Java province and also Indonesia such as raw water for drinking water of Surabaya, the second biggest city in Indonesia, it seems that it is necessary to

be continued forward by studying on verification of the sources of inorganic micro-pollutant in order to chose the priority of the appropriate solution to be implemented in the pollution control program.

6. References

1. Fulazzaky, M. A.; (2000); Water quality management, Lecture's document published for internal students of the Institute of Technology Bandung and the Diponegoro University Semarang
2. Oudin, L. C., Meybeck, M., and Roussel, P., (1999); Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau, Rapport de presentation SEQ-Eau (version 1), Agence de l'eau Loire-Bretagne, Orleans
3. Rapport of internal study Directorate of Water Resources Planning and Management, (2003); Preparation of water quality index for indicating the river water quality degradation; Directorate General of Water Resources – Ministry of Settlement and Regional Infrastructures, Jakarta.

Pengaruh Dosis Iradiasi Pada Khitosan Sebagai Bahan Penginduksi Pertumbuhan Tanaman Cabe (*CaciumAnnum*)

Gatot Trimulyadi R, Kadariah, Anik Sunarni, Isni Marlianti dan Dian Iramani

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi
Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Cinere, Ps Jumat PO Box 7002 JKSL, Jakarta 12070
Fax : 021 7513270. E-mail : gatot28@batan.go.id

Abstrak

Telah dilakukan penelitian pengaruh iradiasi pada khitosan terhadap pertumbuhan (Growth promoters) tanaman cabe (*Capcinum annum*). Khitosan diiradiasi dengan sinar gamma yang berasal dari ^{60}Co dengan dosis 0, 25, 50 dan 100 kGy. Khitosan yang digunakan dengan derajat deasetilasi 81,5 %, hasil isolasi dari kulit udang putih dan kemudian dilakukan proses deasetilasi dengan 50 % larutan NaOH. Khitosan yang telah diencerkan dengan air dan dengan kepekatan 50 ppm disiramkan pada tanaman cabe sebanyak 300 mL/tanaman setiap 2 hari sekali. Hasil iradiasi menunjukkan bahwa iradiasi mempengaruhi massa molekul relatif khitosan dari $1,650 \cdot 10^4$ menjadi $5,88 \cdot 10^2$ Dalton dan kelarutan khitosan pada 1 % asam asetat dari 0,045 sampai 0,146 g/mL pada dosis 0 sampai 100 kGy. Hasil pengujian khitosan iradiasi terhadap pertumbuhan tanaman cabe memperlihatkan bahwa penyiraman tanaman dengan larutan yang mengandung 50 ppm khitosan dapat meningkatkan tinggi tanaman sebesar 79,2 % dengan derajat peningkatan pertumbuhan sebesar 97,5 % pada umur 3 bulan.

Kata kunci : Khitosan, iradiasi, induksi pertumbuhan, tanaman cabe.

1. Pendahuluan

Kulit udang dan cangkang kepiting banyak mengandung khitin yang dapat dibuat turunannya yaitu khitosan. yang banyak manfaatnya, Khitosan adalah derivat terdeasetilasi dari khitin, poli- β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukosa yang merupakan polimer multifung-sional karena memiliki gugus-gugus fungsional seperti amino, gugus hidroksil primer serta sekunder pada struktur glukosamin. Khitosan iradiasi oleh negara-negara Asia seperti Jepang, China, Vietnam dan Korea telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan penginduksi pertumbuhan (*growth promoters*) untuk tanaman^(1,4,5).

Iradiasi pengion seperti sinar gamma dan mesin pemercepat berkas elektron dapat merubah struktur dan sifat kimia lewat pengikatan silang, degradasi atau polimerisasi. Khitosan

termasuk polimer alam yang mudah terdegradasi bila di iradiasi dan akan terbentuk khitosan dengan massa molekul relatif rendah sehingga lebih mudah diserap oleh tanaman^(2,3). Selain itu khitosan memiliki sifat sebagai pengkelat ion logam sehingga dapat mengurangi logam berat pada media tanah yang dapat menimbulkan stress tanaman dan juga berfungsi sebagai anti mikroba⁽³⁾.

Penelitian ini mempelajari pengaruh dosis iradiasi pada khitosan yang selanjutnya akan dipergunakan sebagai bahan penginduksi pertumbuhan untuk tanaman cabe. Sumber iradiasi yang digunakan adalah sinar gamma yang berasal dari ^{60}Co . Parameter yang diteliti adalah pengaruh dosis iradiasi terhadap sifat kelarutan dan massa molekul khitosan dan di aplikasikan terhadap derajat peningkatan tinggi dan peningkatan pertumbuhan pada tanaman cabe. Penggunaan khitosan sebagai bahan

penginduksi pertumbuhan diharapkan dapat meningkatkan produksi dan mempercepat masa panen.

2. Percobaan

Bahan penelitian yang digunakan adalah limbah kulit udang putih (*Peneaus Merguensis*), bahan kimia HCl (teknis), NaOH (Teknis, PA) dan Asam asetat (PA) dan benih cabe varietas tombak super LV .

Isolasi khitin

Proses isolasi khitin terdiri dari beberapa tahap, yaitu :

a. Demineralisasi

Sebanyak 1000 g kulit udang kering yang telah dibersihkan dimasukkan ke dalam larutan 1 N asam khlorida dengan perbandingan padatan dan larutan 1 : 10, campuran diaduk dan dibiarkan pada suhu kamar selama 24 jam.

b. Deproteinasi

Hasil dari proses demineralisasi dilanjutkan dengan proses deproteinasi denga 1 N NaOH, pada suhu 80°C selama 5 jam sambil diaduk perlahan lahan.

Tahap deasetilasi

Khitin yang diperoleh dari hasil isolasi kemudian dilanjutkan ke tahap deasetilasi dengan larutan 50 % NaOH dengan perbandingan padatan dan cairan 1 : 15 . Campuran dipanaskan pada suhu 100⁰- 110 ⁰C selama 3 jam kemudian dipisahkan dan dibilas dengan air dimeneral dan keringkan dalam oven pada temp 105⁰C, kemudian ditentukan kadar air, kadar abu dan derajat deasetilasinya.

Tahap Iradiasi

Khitosan yang dihasilkan dimasukkan dalam kantong-kantong plastik kemudian di iradiasi dengan sinar gamma dengan dosis 0, 25, 50, dan 100 kGy mempergunakan laju dosis 5,8 kGy/jam.

Pengujian khitosan sebagai penginduksi pertumbuhan tanaman

Khitosan yang telah di iradiasi dibuat larutan induk dengan konsentrasi 5 g/L, larutan induk kemudian dituangkan kedalam air siraman dengan perbandingan 1:100 dan air siraman yang mengandung khitosan (50 ppm) disiramkan pada tanaman cabe sebanyak 300 mL / tanaman dengan selang penyiraman 2 hari sekali. Setelah 30 hari dihitung peningkatan tinggi tanaman, yaitu tinggi rata-

rata tanaman yang diperlakukan dibandingkan dengan tanpa perlakuan dan derajat peningkatan pertumbuhan, yaitu berat rata-rata dengan perlakuan dibandingkan dengan berat rata-rata tanpa perlakuan.

3. Hasil dan Pembahasan

Pengaruh iradiasi terhadap masa molekul, kelarutan.

Massa molekul

Massa molekul khitosan ditentukan berdasarkan metode viskositas. Pemakaian metode ini mempunyai beberapa keuntungan, antara lain analisisnya lebih mudah dan lebih cepat, alat dan perhitungannya sederhana. Alat yang digunakan adalah viskosimeter Oswald.

Pengaruh dosis iradiasi terhadap massa molekul relatif khitosan ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hubungan antara dosis iradiasi dan massa molekul relatif

No	Dosis iradiasi (kGy)	Massa molekul (10 ⁴)
1	0	1,6506
2	25	0,9220
3	50	0,14032
4	100	0,05880

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis iradiasi berpengaruh terhadap massa molekul khitosan, semakin besar dosis iradiasi massa molekul khitosan relatif bertambah rendah. Hal ini disebabkan karena iradiasi mengakibatkan rantai polimer terdegradasi, makin besar dosis iradiasi maka pemutusan ikatan menjadi banyak sehingga massa molekul menjadi relatif lebih kecil. Menurut Rosiak *et,al* iradiasi pada polisakarida seperti pati, khitin dan khitosan mengakibatkan pemutusan rantai terutama pada ikatan glikosida.

Kelarutan

Kelarutan menunjukan jumlah zat yang dapat dilarutkan dalam tiap bagian pelarut. Kelarutan khitosan dilakukan untuk memberikan informasi dalam aplikasi khitosan sebagai bahan penginduksi pertumbuhan. Pada penelitian ini sifat kelarutan khitosan dilakukan dalam 1 % asam asetat sampai terbentuk larutan jenuh.

Tabel 2 memperlihatkan kelarutan khitosan pada beberapa variasi dosis iradiasi.

Tabel 2. Hasil analisis kelarutan khitosan dalam asam asetat

No	Dosis iradiasi (kGy)	Kelarutan (g/mL)
1	0	0,045
2	25	0,107
3	50	0,120
4	100	0,146

Dari Tabel 2 tampak bahwa kelarutan khitosan dalam 1 % khitosan berkisar antara 0,045 sampai 0,146 g/mL. Di sini terlihat adanya hubungan antara dosis iradiasi dengan kelarutan, makin besar dosis iradiasi yang digunakan, sifat kelarutannya juga makin besar. Hal ini dapat dijelaskan dengan bertambahnya dosis iradiasi yang digunakan massa molekul khitosan menurun dan jumlah ikatan hidrogen yang ada menjadi lebih sedikit, sehingga kelarutannya akan meningkat.

Pengaruh pemberian khitosan iradiasi terhadap tinggi tanaman cabe.

Hasil pengujian khitosan iradiasi terhadap tinggi tanaman cabe setelah berumur 3 bulan disajikan pada Tabel 3.

Hasilnya menunjukkan bahwa makin besar

dosis iradiasi pada khitosan, tanaman cabe makin tinggi sesuai dengan makin besarnya dosis iradiasi. Di atas dosis iradiasi 50 kGy persentasi peningkatan pertumbuhan menunjukkan lebih dari 50 %. Hal ini di karenakan dengan bertambah besarnya dosis iradiasi, khitosan massa molekulnya lebih rendah sehingga lebih mudah diserap oleh tanaman. Hasil ini menunjukkan bahwa khitosan iradiasi dapat berfungsi sebagai bahan penginduksi pertumbuhan tanaman cabe.

Derajat peningkatan pertumbuhan (%)

Derajat peningkatan pertumbuhan dihitung dari berat rata-rata tanaman dengan perlakuan dikurangi berat rata-rata tanpa perlakuan (kontrol) kemudian dibagi dengan berat rata-rata tanpa perlakuan (kontrol) dikalikan dengan 100 %. Perhitungan setelah masa tanam 3 bulan ditunjukkan pada Tabel 4.

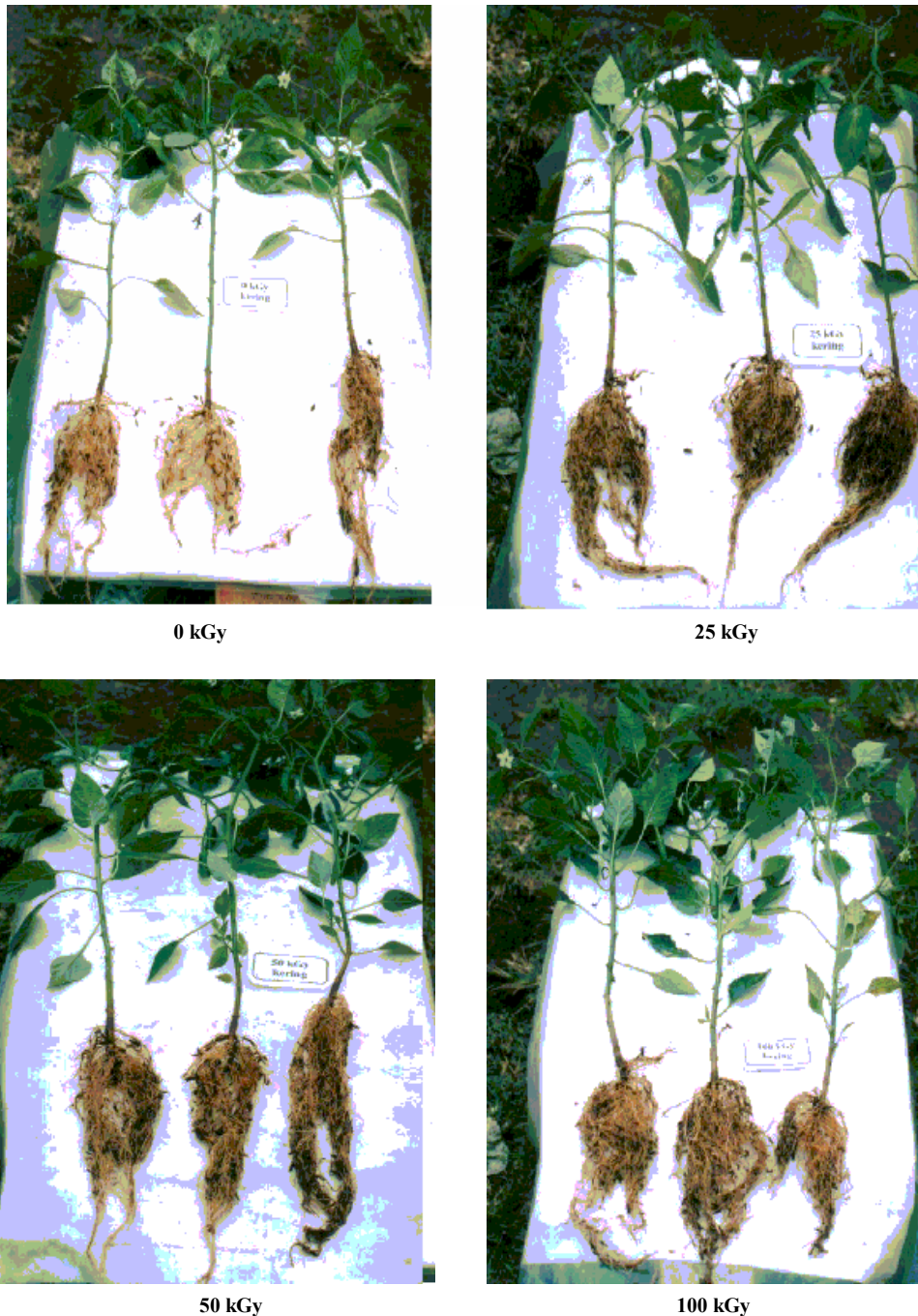
Hasilnya menunjukkan bahwa dengan meningkatnya dosis iradiasi presentasi derajat peningkatan pertumbuhan makin meningkat. Pada dosis iradiasi 100 kGy menunjukkan peningkatan yang cukup tinggi, yaitu sebesar 97,5 %. Hal ini dikarenakan dengan penambahan oligo khitosan pada air siraman akan meningkatkan jumlah akar pada tanaman. Dengan jumlah akar yang banyak dan sehat, tanaman akan besar dan tumbuh lebih baik

Tabel 3. Pengaruh pemberian khitosan iradiasi terhadap tinggi tanaman cabe setelah berumur 3 bulan

No	Dosis iradiasi (kGy)	Tinggi tanaman (cm)										Rata-rata tinggi tanaman (cm)	Peningkatan (%)
		No tanaman											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0	34	36	35	37	33	34	35	39	34	34	35,1 ± 1,34	30,4
2	25	37	38	39	37	38	39	38	37	36	38	37,7 ± 0,76	40,0
3	50	45	45	44	46	47	44	45	46	47	48	45,7 ± 1,10	69,8
4	100	48	48	47	49	50	48	47	48	49	48	48,2 ± 0,68	79,2
Kontrol (air)		26	28	28	29	25	26	27	25	28	27	26,9 ± 1,12	0

Tabel 4. Pengaruh dosis iradiasi terhadap derajat peningkatan pertumbuhan

No	Dosis iradiasi (kGy)	Berat kering rata-rata 10 pohon tanaman cabe (g)	Derajat peningkatan pertumbuhan (%)
1	0	10,8	31,7
2	25	12,2	48,7
3	50	15,8	92,6
4	100	16,2	97,5
Tampa perlakuan (kontrol)		8,2	0,0



Gambar 1. Pengaruh dosis iradiasi terhadap banyaknya akar pada tanaman cabe

dibandingkan dengan jumlah akar yang sedikit.

Pengaruh penambahan oligo khitosan pada air penyiraman terhadap banyaknya akar tanaman cabe ditunjukkan pada Gambar 1.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dosis iradiasi sangat berpengaruh terhadap massa molekul dan kelarutan khitosan. Pada dosis iradiasi 100 kGy didapatkan massa molekul khitosan $5,88 \cdot 10^2$ Dalton dan kelarutannya pada 1 % asam asetat 0,146 g/mL.

Hasil pengujian khitosan iradiasi sebagai bahan penginduksi pertumbuhan pada tanaman cabe, memperlihatkan bahwa penyiraman tanaman dengan air yang mengandung 50 ppm khitosan setiap 2 hari sekali menunjukkan peningkatan tinggi tanaman sebesar 79,2 % dengan derajat peningkatan pertumbuhan 97,5 % pada umur 3 bulan.

5. Daftar Pustaka

1. Goosen, M.F.A., *Application of Chitin and Chitosan*, Technomic Publishing Company, Inc, Lancaster, Pennsylvania, USA. 1997.
2. Sabharwal S, Radiation effect on polymers, Risalah Proceeding Meeting Radiation Processing of Polysacchararides, Vietnam Atomic Energy Commision, Vietnam, 2000.
3. Ulanski, Rosiak,J, Preliminary studies on Radiation –Induced Change in Chitosan, Radiat. Phys. Chem, Vol 39, No 1, Pergamon Press, Great Britain, 1992
4. Kurita, K; Koyama,Y ; and Taniguchi, A. *Journal of Applied Polymer Science.* 1986 , 31, 1169 – 1176.
5. Hong, K.N.O ; Mayers, S.P; Lee, K.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989 , 37 ,(3) , 575 – 579.

Prediction of Solvent Vapor Solubility in Polymer Solutions Using Group Contribution Models

Gede Wibawa

Department of Chemical Engineering, Faculty of Industrial Technology,
Sepuluh Nopember Institute of Technology (ITS)
Kampus ITS Sukolilo Surabaya, 60111
Tel: 031-5946240; Fax: 031-5999282; E-mail: gwibawa@chem-eng.its.ac.id

Abstract

In this work, four group contribution models (UNIFAC-FV, Entropic-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV) were evaluated based on an extensive database that covers solvent activities containing alkane and cycloalkane, aromatic and polar solvents. For the three type solvents studied, the investigation showed that all models studied gave the best prediction results for systems containing aromatic solvents. Errors were highest for systems containing polar solvents. For the overall results, Entropic-FV model was the best model with the average absolute deviation (AAD) between experimental and predicted solvent activities of 15.3% while AADs of UNIFAC-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV models were 15.9, 23.8 and 33.6 %, respectively.

1. Introduction

Many polymeric materials are produced with solvent, and it is necessary to remove the remaining solvents and nonpolymerized monomers from polymer final products. Rational design of such equipments or processes requires knowledge of solvent vapor solubilities in polymer solutions. In engineering applications, estimation techniques such as group contribution methods can save time and money, since experimental data are frequently unvaliable (Chen and Mathias, 2002).

Predictive models based group contribution model such as UNIFAC-FV model of Oishi and Prausnitz (1978), Entropic-FV model of Elbro et al. (1990), UNIFAC-ZM model of Zhong et al. (1996) and ASOG-FV model of Tochigi (1998) have been used with good success for prediction of solvent solubility in polymer solutions. Since these models used group interaction parameters evaluated from vapor-liquid equilibrium (VLE) data of low molecular fluid substances, they can be applied to more classes of polymer solutions.

The objective of this work is to evaluate the

accuracy of UNIFAC-FV, Entropic-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV models in solvent activity prediction based on an extensive database ranging from systems containing nonpolar to polar solvents. The rest of this paper were organized as follows. First, the database used is presented. Second, a brief discription of models considered. Third, presentation of accuracy of each model in prediction of solvent activities in polymer solutions. We close with our conclusion.

2. Database

Database used in this work to evaluate four predictive group contribution models were finite concentration of solvent solubility in polymer solutions consisting of 16 polymers and 39 solvents with various temperatures containing a large variety of solvent and polymer ranging from non-polar to strongly polar substances. The data were collected from the polymer solution data collections of Wen et al. (1992) and Wohlfarth (1994) and other literature (Wibawa et al., 2002a and 2002b).

3. Description of the group contribution models

The UNIFAC-FV model. For low molecular fluid systems, UNIFAC model (Fredenslund, 1975) is a good predictive model and has been used in many applications. However, when this model is applied to polymer solutions, predicted solvent activities tend to be underestimated compared with experimental data. Accordingly, Oishi and Prausnitz (1978) modified the UNIFAC model by adding free volume term obtained from the Flory equation of state to the model. The modified UNIFAC model is called UNIFAC Free-Volume (UNIFAC-FV) model. For a binary mixture, the activity of solvent is:

$$\ln a_1 = \ln a_1^C + \ln a_1^R + \ln a_1^{FV} \quad (1)$$

where $\ln a_1^C$ and $\ln a_1^R$ are the combinatorial and the residual terms taken from original UNIFAC model, respectively. The free volume term, $\ln a_1^{FV}$ is expressed by:

$$\ln a_1^{FV} = 3c_1 \ln \left[\frac{\tilde{v}_1^{1/3} - 1}{\tilde{v}_M^{1/3} - 1} \right] - c_1 \left[\left(\frac{\tilde{v}_1}{\tilde{v}_M} - 1 \right) \left(1 - \frac{1}{\tilde{v}_1^{1/3}} \right)^{-1} \right] \quad (2)$$

The reduced volume of solvent, \tilde{v}_1 is given by:

$$\tilde{v}_1 = \frac{v_1}{15.17br_1'} \quad (3)$$

$$r_i' = \frac{1}{M_i} \sum_k v_k^{(i)} R_k \quad (4)$$

where $v_k^{(i)}$ is the number of groups of type k in molecule i . To simplify the calculation, the volume of liquid mixture was assumed to be additive. Then, the reduced volume for the mixture is given by:

$$\tilde{v}_M = \frac{v_1 w_1 + v_2 w_2}{15.17b(r_1' w_1 + r_2' w_2)} \quad (5)$$

The free-volume term contains two adjustable parameters (b and c_1), where c_1 is defined to be one-third external degrees of freedom and set equal to 1.1, and b is a proportionality factor on the order to unity that was determined a b value of 1.28.

The Entropic-FV model. The Entropic-FV model proposed by Elbro et al. [3], combines the combinatorial and free-volume effects and is given by:

$$\ln a_1^{C+FV} = \ln \phi_1^{FV} + 1 - \frac{\phi_1^{FV}}{x_1} \quad (6)$$

where the free volume fraction, ϕ_1^{FV} is given by:

$$\phi_1^{FV} = \frac{x_1(V_1 - V_{wi})}{\sum x_i(V_i - V_{wi})} \quad (7)$$

The van der Waals volume, V_{wi} is calculated by the method of Bondi. For the residual contribution of the model, UNIFAC residual term was used with the group interaction parameters were determined from VLE data of low molecular weight systems.

The UNIFAC-ZM model. Since the previous models require information about volumetric properties for both solvent and polymer, Zhong et al. (1996) proposed a UNIFAC model that incorporated a relation for the volume parameter, $r(n)$, for an n -mer polymer and that for the monomer, $r(1)$. For an n -mer chain molecule the volume parameter was set equal to:

$$r(n) = 0.6583nr(1) \quad (12)$$

where $r(1)$ is the volume parameter of the monomer. Thus the modified combinatorial term was:

$$\ln a_1^C = \ln \phi_1' + 1 - \frac{\phi_1'}{x_1} - \frac{zq_1}{2} \left[\ln \frac{\phi_1}{\theta_1} + 1 - \frac{\phi_1}{\theta_1} \right] \quad (13)$$

where

$$\phi_1' = \frac{x_1 r_1}{x_1 r_1 + x_2 [0.6583nr(1)]} \quad (14)$$

According to the authors, this model can account for the free-volume effect, even though no explicit free-volume term is involved.

ASOG-FV model. Tochigi (1988) developed ASOG-FV model for the application in polymer solutions by adding the free-volume term of the UNIFAC-FV model to the original ASOG model of Wilson and Deal (1962). This model also used group interaction parameters obtained from VLE data of low molecular weight substances (Tochigi et al., 1990) for its residual term.

The four group contribution models evaluated here were obtained by accounting for free volume effect expressed in different ways.

Table 1 AAD between experimental and predicted solvent activities by group contribution models (Eq. A = UNIFAC-FV, Eq. B = Entropic-FV, Eq. C = UNIFAC-ZM and Eq. C = ASOG-FV)

Polymer	AAD ^a [%]											
	alkane & cycloalkane				aromatic				polar			
	Eq.A	Eq.B	Eq.C	Eq.D	Eq.A	Eq.B	Eq.C	Eq.D	Eq.A	Eq.B	Eq.C	Eq.D
PI	27.7	21.5	18.4	22.8	18.4	17.1	15.7	20.2	20.6	19.7	38.1	47.0
PIB	8.1	13.7	25.0	14.2	9.4	9.0	10.2	31.7	21.4	19.6	30.9	58.6
PBMA	6.4	9.2	6.8	23.7	8.9	9.7	11.3	40.8	14.3	15.6	33.3	25.2
PVAc	24.4	27.2	29.9	80.7	16.4	13.4	12.0	24.1	22.3	12.2	47.1	31.2
PS	6.9	16.7	5.7	35.2	8.4	4.8	3.3	15.5	11.9	19.7	10.2	60.6
PPO					7.0	5.0	7.8	18.4	41.5	24.4	32.4	16.6
PMMA					6.7	10.4	8.4	13.2	6.9	8.0	9.2	5.9
PEO					2.0	1.0	5.3	9.2	66.0	27.0	49.7	41.6
PE									9.3	18.5	28.5	2.4
PDMS	7.3	4.8	30.8		3.8	4.2	25.5	0.0	18.0	18.1	11.3	
PCS					15.2	14.1	6.8	17.9				
PBD	12.8	19.7	12.0	21.4	16.1	15.5	18.6	28.2	12.9	17.8	25.9	53.4
P α MS					4.7	2.6	5.2	5.3				
PH					9.0	5.8	10.2	7.5				
PDD					15.9	11.8	6.0	9.7				
PD					6.3	3.2	12.6	9.2				
Overall	12.1	14.9	21.4	26.3	11.1	9.7	11.1	22.0	20.0	17.9	31.2	42.6

Table 3 AAD between experimental and predicted group contribution models for each category of systems

Solvent/ Model	AAD ^a [%]			
	UNIFAC-FV	Entropic-FV	UNIFAC-ZM	ASOG-FV
alkane & cycloalkane	12.1	14.9	21.4	26.3
aromatic	11.1	9.7	11.1	22.0
Polar	20.0	17.9	31.2	42.6
Overall	15.9	15.3	23.8	33.6

Additionally, the models used the residual term for accounting effects of enthalpy of mixing with group interaction parameters were optimized from low molecular fluid substances.

3. Result and Discussion

Group contribution models (UNIFAC-FV, Entropic-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV) were evaluated using database ranging from systems containing nonpolar to strongly polar solvents. All databases considered in this work were split up into three categories that are systems containing alkane and cycloalkane, aromatic, and polar solvents. The results were presented in Table 1, which shows average absolute deviation (AAD) between predicted and experimental solvent activities. The overall

AAD was calculated in ordinary way by assigning each system the same weight. This procedure was applied because the number of systems varies for each polymer. For systems containing PDMS, solvent activity calculations using ASOG-FV model could not be made because of unavailability of its group interaction parameters. From three categories of solvents studied, the four models gave the best prediction results for systems containing the aromatic solvents, however, the worse results were obtained for systems containing the polar solvents. From four group contribution models studied, ASOG-FV model gave the poorest prediction results for all system categories. For systems containing alkane and cycloalkane solvents, UNIFAC-FV

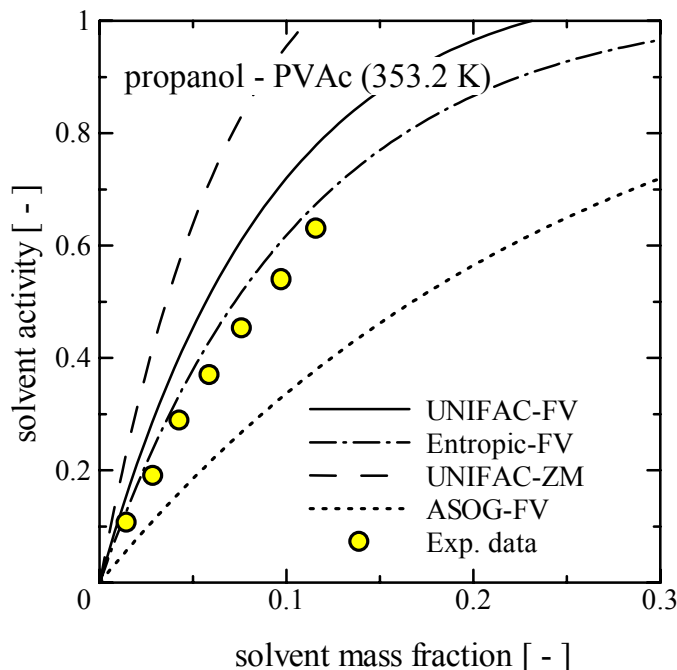


Fig 1 Experimental and predicted activity coefficients by UNIFAC-FV, Entropic-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV

model gave the best prediction result with 12.1 % AAD and for systems containing aromatic and polar solvents, Entropic-FV model gave the best prediction result with 9.7 and 17.9 % AAD, respectively.

Table 2 is summary of Table 1 that shows AAD between experimental and predicted group contribution models for each category of systems. From the table shows that Entropic-FV model gave the best performance for overall systems studied with overall AAD of 15.3%. Overall AADs of Entropic-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV models were 15.9, 23.8 and 33.6 %, respectively. However UNIFAC-ZM model should be considered when accurate polymer molar volume unvaliable. Illustration of accuracy of predictive group contribution models represented in Fig 1 for propanol-PVAc systems at 353.2 K.

4. Conclusion

The investigation showed that all models studied gave the best prediction results for systems containing aromatic solvents. Errors were highest for systems containing polar solvents. For three catagory solvents studied, ASOG-FV gave the poorest results. For the overall results, Entropic-FV model was the best model with AAD between experimental and predicted solvent activities of 15.3% while

AADs of UNIFAC-FV, UNIFAC-ZM and ASOG-FV models were 15.9, 23.8 and 33.6 %, respectively.

5. Literature cited

- Chen C. C and Mathias P. M., (2002). Applied Thermodynamics for Process Modeling, AIChE J., 48, p. 194-200.
- H. S. Elbro, Aa. Fredenslund and P. Rasmussen, Macromolecules, (1990). A New Simple Equation for Prediction of Solvent Activities in Polymer Solutions, 23, 4707-4714.
- Fredenslund, Aa., Jones, R. L. and Prausnitz, J. M., (1975). Group Contribution Estimation of Activity Coefficients in Nonideal Liquid Mixtures, AIChE J., 21, 1085-1099.
- Oishi, T. and Prausnitz, J. M., (1978). Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions Using a Group Contribution Method, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 17, 333-339.
- Tochigi, K., (1998). Prediction of Vapor-Liquid Equilibria in Non-polymer and Polymer Solutions Using an ASOG-based Equation of State (PRASOG), Fluid Phase Equilib., 144, 59-68.
- Tochigi K., Tiegs D, Gmehling J and Kojima K., (1990). Determination of New ASOG parameters, J. Chem. Eng. Jpn. 23, 453-463.
- Wen H., Elbro H. S., Alessi P. (1992). Polymer Data Collection Part 1, DECHEMA Chemistry Data Series; DECHEMA Frankfurt am Main, Germany.

Gede Wibawa

Wohlfarth C., (1994). Vapour-Liquid Equilibrium Data of Binary Polymer Solutions: Vapour-Pressures, Henry's Constants and Segment Molar Excess Gibbs Free Energies, Elsevier B. V., Amsterdam, The Netherlands.

Wibawa G., Hatano R. Sato Y. and Masuoka H., (2002a). Solubility of 11 polar organic solvents in four polymers using the piezoelectric-quartz sorption method, J. Chem. Eng. Data, 47 (4), 1022-1029.

Wibawa G., Takahashi M. Sato Y. and Masuoka H., (2002b). Solubility of seven nonpolar organic

solvents in four polymers using the piezoelectric-quartz sorption method, J. Chem. Eng. Data, 47 (3), 518-524.

Wilson G. M. and Deal C. H., (1962). Activity coefficients and molecular structure, Ind. Eng. Fundamen., 1, 20-23.

Zhong C., Sato Y., Masuoka H. and Chen X., (1996). Improvement of predictive accuracy of the UNIFAC model for vapor-liquid equilibria of polymer solutions, Fluid Phase Equilib., 123, 97-1

Polymer symbols

PI	: polyisoprene	PS	: polystyrene
PIB	: polyisobutylene	PαMS	: poly(α -methyl styrene)
PBMA	: poly(n-butyl methacrylate)	PBD	: polybutadiene
PVAc	: poly(vinyl acetate)	PEO	: poly(ethylene oxide)
PE	: polyethylene	PPO	: poly(propylene oxide)
PH	: polyheptene-1	PMMA	: poly(methyl methacrylate)
PD	: polydecene-1	PCS	: poly(4-chloro styrene)
PDD	: polydodecene-1	PDMS	: poly(dimethyl siloxane)

List of symbols

a	:	activity (-)
a_{mn}	:	group interaction parameter (K)
F	:	objective function (-)
N	:	number of data point (-)
q	:	group surface parameter (m^2/mol)
R	:	group size parameter (m^3/mol)
r	:	molecular size parameter (m^3/mol)
r'	:	molecular size parameter (m^3/kg)
T	:	temperature (K)
V	:	molar volume (m^3/mol)
v	:	specific volume (m^3/kg)
w	:	weight fraction (-)
x	:	mole fraction (-)
z	:	coordination number ($z = 10$)
θ	:	surface area fraction (-)
ϕ	:	volume fraction (-)
ϕ'	:	modified volume fraction (-)
Ψ_{mn}	:	group interaction parameter (-)

Superscripts

C	:	combinatorial term
FV	:	free volume term
R	:	residual term

Subscripts

1, 2	:	solvent, polymer
cal.	:	calculated value
exp.	:	experimental value
i, k	:	component or segment
M	:	mixture
w	:	van der Waals

Taburan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang dan hasil luluhawanya di kawasan Sungai Merbok, Kedah

Habibah HJ Jamil, Wan Fuad Wan Hassan & Mohamad MD Tan

Program Geologi, Pusat Sains Sekitaran dan Sumber Alam, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

Abstrak

Formasi Mahang terdiri daripada batuan syal, sabak merah, sabak kelabu dan sabak hitam. Unit batuan syal di kawasan Sungai Merbok, Kedah telah mengalami luluhawa kimia yang tinggi dan bertukar menjadi tanah. Kepekatan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang dan hasil luluhawanya dikaji bagi mengenalpasti sebaran logam-logam berat tersebut apabila batuan bertukar menjadi tanah. Sebanyak 40 sampel batuan dan tanah telah digunakan bagi tujuan tersebut. Kandungan unsur major dan kepekatan Pb, Cr dan Cu dalam batuan dan tanah ditentukan menggunakan kaedah pendarfluor sinar-X (XRF). Kajian petrografi dilakukan terhadap 10 sampel terpilih bagi menentukan komposisi mineral dalam batuan syal. Kajian ini mendapati taburan Pb, Cr dan Cu bergantung kepada komposisi kimia batuan syal. Batuan syal merah mengandungi kepekatan Pb, Cr dan Cu yang lebih tinggi berbanding batuan syal kelabu kerana ia mempunyai kandungan matriks yang lebih tinggi. Pb tertabur dalam batuan syal yang mengandungi banyak MnO. Cr terkandung dalam mineral filosilikat dan oksida besi manakala Cu hadir bersama-sama dengan oksida besi. Akibat luluhawa, kandungan Al_2O_3 , TiO_2 , K_2O dan Cr meningkat, SiO_2 dan Pb menyusut manakala Fe_2O_3 dan Cu tidak berubah. Dalam tanah, Pb, Cr dan Cu berasosiasi dengan mineral lempung dan oksida Al dan Fe. Sebahagian daripada Cr masih berada dalam mineral filosilikat. Taburan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang berlaku sewaktu proses pembentukannya di persekitaran laut dalam. Apabila luluhawa berlaku, logam berat tersebut tersebar semula dan terhimpun bersama-sama dengan mineral dan bahan sekunder yang lebih stabil dalam tanah.

1. Pendahuluan

Formasi Mahang merupakan unit batuan terbesar yang melitupi kawasan Sungai Merbok, Kedah. Ia berusia Ordovisi Tengah hingga Devon Awal. Batuan syal terdiri daripada syal dan sebahagiannya telah termetamorfisme bergred rendah menjadi sabak merah, sabak hitam dan sabak kelabu. Jones (1973) menafsirkan batuan syal Formasi Mahang sebagai endapan laut dalam. Batuan syal merah mengandungi ferik oksida yang lebih tinggi kerana ia merupakan bahagian atas jujukan sedimen sewaktu diendapkan dan berada di kawasan pengoksidaan. Batuan syal kelabu pula merupakan endapan sedimen di rabung geantiklin manakala kandungan karbon dalam syal kelabu dan hitam berasal daripada lumpur kaya karbon atau fitoplankton yang

hidup di sekitar laut dalam (Jones 1973).

Kawasan kajian mengalami iklim panas lembab, iaitu menerima hujan tahunan sebanyak 2260 mm dan suhu setinggi 28.2°C (Perkhidmatan Kaji cuaca Malaysia 1996). Batuan syal di kawasan kajian telah mengalami luluhawa kimia yang tinggi dan bertukar menjadi laterit dan tanah berwarna coklat kekuningan hingga kemerahan. Proses luluhawa kimia yang tinggi boleh menyebabkan penyebaran semula logam berat ke alam sekitar apabila mineral perumahnya terurai (Rose & Hawkes 1979). Penyebaran semula logam berat secara tabii perlu diketahui kerana logam berat yang berada dalam fraksi bukan baki berkelakuan seperti logam berat antropogenik. Kajian oleh Habibah & Wan

Fuad (2002) mendapati beberapa jenis logam berat dalam batuan syal Formasi Mahang mengalami pengayaan ataupun penyusutan di sepanjang profil luluhawa. Perbincangan yang lebih khusus diperlukan bagi memahami taburan logam berat dalam batuan syal dan sebarannya apabila batuan mengalami luluhawa kimia yang tinggi. Bagi tujuan tersebut, tiga jenis logam berat telah dipilih iaitu Pb, Cr dan Cu. Penekanan diberikan kepada taburan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal merah dan syal kelabu serta hubungannya dengan komposisi kimia batuan tersebut. Taburan Pb, Cr dan Cu serta asosiasinya dengan unsur major dalam tanah juga dikenalpasti bagi memahami sebaran logam berat tersebut apabila batuan terluluhawa menjadi tanah.

2. Bahan dan Kaedah

Kandungan unsur major dan kepekatan Pb, Cr dan Cu ditentukan daripada 40 sampel batuan dan tanah syal Formasi Mahang menggunakan teknik pendarflour sinar-X model PW 1480 mengikut kaedah Norrish & Hutton (1969). Kajian petrografi dilakukan terhadap 10 sampel

terpilih bagi menentukan komposisi mineral dalam batuan syal. Kandungan mineral dalam batuan dan tanah syal dianalisis menggunakan teknik belauan sinar-X (XRD).

3. Keputusan

Batuan syal Formasi Mahang.

Batuan syal Formasi Mahang berbutir halus dan mempunyai isihan yang baik. Komposisi utama batuan syal ditunjukkan dalam Jadual 1. Batuan syal merah terdiri daripada kuarza (40-15%), matriks (40-45%) dan oksida besi (15-20%). Berdasarkan ujian belauan sinar-X (XRD), batuan syal merah terdiri daripada kuarza, muskovit dan kaolinit. Oksida besi tertabur di antara butiran kuarza dan mineral filisilikat dalam matriks. Pada beberapa tempat, ia terhimpun lalu membentuk laminasi oksida besi. Batuan syal merah mempunyai kandungan Fe_2O_3 , Al_2O_3 dan K_2O yang lebih tinggi berbanding dengan syal kelabu (Jadual 2). Kandungan Fe_2O_3 dalam batuan syal merah lebih tinggi kerana ia mengandungi oksida besi yang lebih banyak. Al_2O_3 merupakan salah satu komponen utama yang membentuk

Jadual 1 Peratusan komposisi mineral batuan syal di Ladang United Pillai

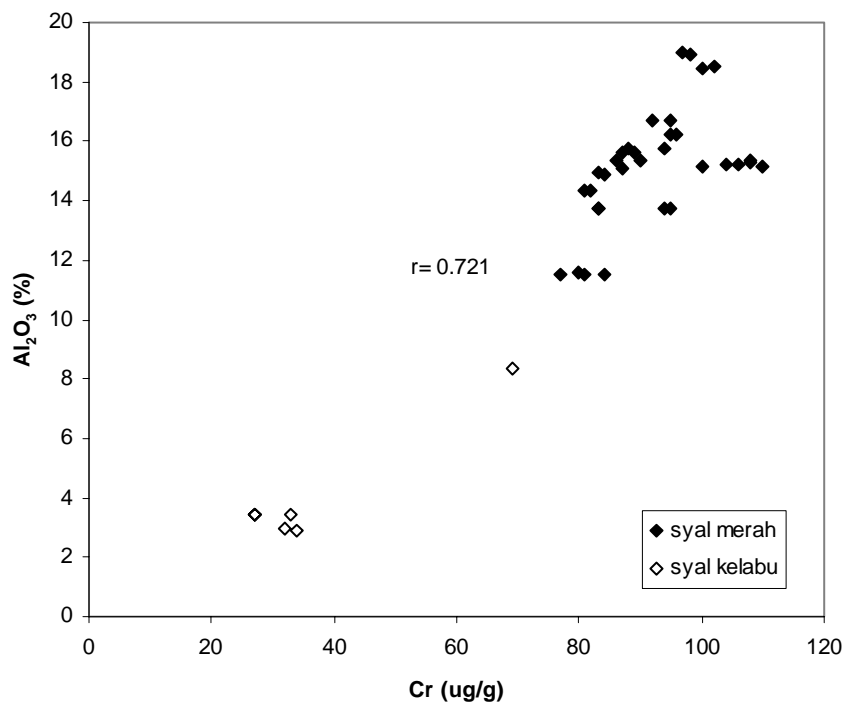
MINERAL	Pi7*	Pi8*	Pi17*	Pi15*	Pi18*	UP31	UP32	UP33	PiSS1	PiSS3
Kuarza	40	40	45	45	40	70	70	70	65	70
Oksida besi	20	25	15	15	15	25	25	25	25	20
Matriks	40	35	40	40	45	<5	<5	<5	5	10
Jumlah	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

* syal merah

Jadual 2 Keputusan ujian Mann-Whitney menunjukkan perbandingan di antara peratus unsur major serta kepekatan Pb, Cr dan Cu dalam tanah syal di Ladang United Pillai berbanding dengan batuan induknya (N=40).

UNSUR MAJOR	Purata unsur major dalam batuan syal (%) dan logam berat ($\mu\text{g/g}$)	Purata unsur major dalam tanah syal (%) dan logam berat ($\mu\text{g/g}$)	Nilai Z	Nilai P
SiO_2	73.28	60.77	-6.284	0.000*
TiO_2	0.63	1.10	-7.703	0.000*
Al_2O_3	13.18	21.86	-7.698	0.000*
Fe_2O_3	5.35	4.25	-0.332	0.740
MnO	0.14	0.05	-1.757	0.079
MgO	0.54	1.03	-6.782	0.000*
CaO	bdl	bdl	-2.295	0.022*
Na_2O	0.17	0.10	-0.039	0.969
K_2O	2.78	3.66	-2.964	0.003*
P_2O_5	0.03	0.02	-0.624	0.533
Pb	59	35	-0.954	0.340
Cr	84	108	-6.498	0.000*
Cu	43	39	-0.766	0.444

* Nilai $P < 0.05$ menunjukkan unsur major dalam tanah dan batuan syal berbeza secara signifikan.



Rajah 1a Korelasi di antara Cr dengan Al₂O₃ dalam batuan syal di Ladang United Pillai.

mineral lempung (Alloway 1995; Rose et al. 1979). Kandungan Al₂O₃ yang lebih tinggi dalam batuan syal merah menunjukkan kandungan lempung yang tinggi dalam batuan tersebut. Kandungan K₂O yang tinggi pula disebabkan oleh kehadiran mineral filosilikat dalam batuan syal merah.

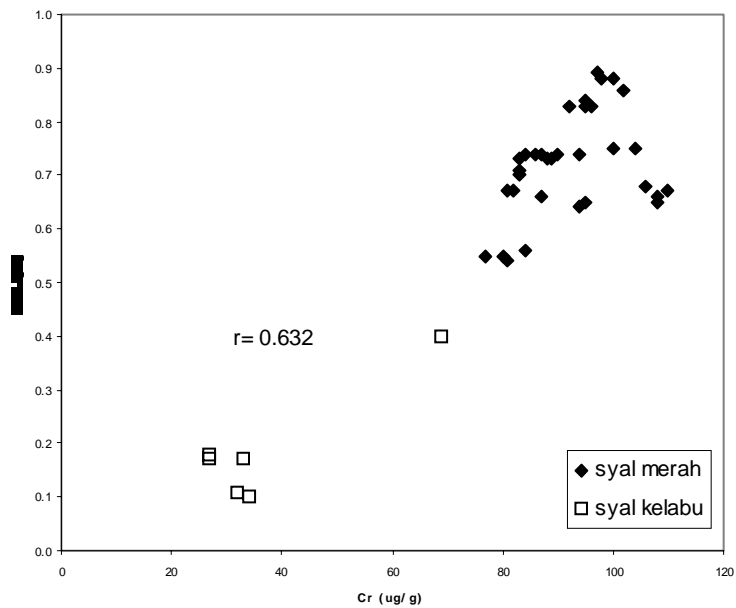
Batuan syal kelabu terdiri daripada kuarza (65-70%) dan matriks (25%). Ujian belauan sinar-X (XRD) menunjukkan hampir keseluruhan batuan syal kelabu terdiri daripada kuarza. Batuan tersebut juga mengandungi SiO₂ yang tinggi berbanding dengan batuan syal merah. SiO₂ merupakan unsur major yang menjadi komponen utama kuarza (Alloway 1995; Rose et al. 1979).

Taburan Pb, Cr dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang.

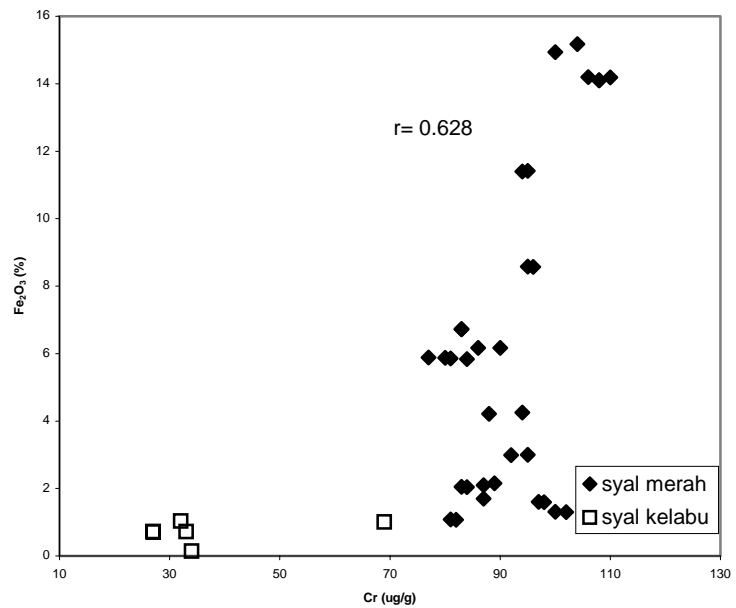
Batuan syal merah mempunyai kepekatan Pb yang lebih tinggi berbanding dengan batuan syal kelabu iaitu masing-masing sebanyak 59 µg/g dan 29 µg/g. Kepekatan Pb dalam batuan syal tidak menunjukkan sebarang korelasi dengan mana-mana unsur major. Hubungan tersebut menjelaskan bahawa taburan Pb dalam batuan syal tidak dipengaruhi oleh mana-mana mineral dalam batuan tersebut. Pada beberapa

sampel iaitu UP2, UP2D, UP15, UP16 dan UP16D, kepekatan Pb didapati meningkat yang mana masing-masing berkepekatan 193 µg/g, 205 µg/g, 188 µg/g 353 µg/g dan 322 µg/g. Sampel-sampel tersebut didapati mengandungi peratusan MnO yang lebih tinggi berbanding dengan sampel-sampel lain.

Kepekatan Cr dalam batuan syal merah juga lebih tinggi berbanding dengan syal kelabu iaitu masing-masing sebanyak 92 µg/g dan 44 µg/g. Nilai Cr menunjukkan hubungan positif signifikan (P<0.05) dengan Al₂O₃ dan TiO₂ (Rajah 1a dan 1b). Hubungan ini menunjukkan kepekatan Cr dalam batuan syal meningkat seiring dengan peningkatan unsur-unsur major yang membentuk mineral filosilikat iaitu Al₂O₃ dan TiO₂ (Tebbens *et al.* 2000). Kepekatan Cr dalam batuan syal merah lebih tinggi kerana mengandungi mineral filosilikat yang lebih banyak berbanding dengan syal kelabu. Nilai Cr juga berkorelasi positif signifikan (P<0.05) dengan Fe₂O₃ (Rajah 1c). Ini menunjukkan kepekatan Cr dalam batuan syal meningkat seiring dengan peningkatan oksida besi. Sebaliknya, Cr berkorelasi negatif signifikan dengan SiO₂. Ini bermakna, kandungan Cr dalam batuan syal merah meningkat apabila kandungan kuarza berkurangan.



Rajah 1b Korelasi di antara Cr dengan TiO_2 dalam batuan syal di Ladang United Pillai.



Rajah 1c Korelasi di antara Cr dengan Fe_2O_3 dalam batuan syal di Ladang United Pillai.

Berbanding dengan batuan syal kelabu, batuan syal merah mengandungi kepekatan Cu yang lebih tinggi. Kepekatan Cu dalam batuan syal merah dan syal kelabu masing-masing sebanyak $44 \mu\text{g/g}$ dan $39 \mu\text{g/g}$. Nilai Cu didapati berkorelasi positif signifikan ($P < 0.05$) dengan Fe_2O_3 dalam batuan syal. Ini menunjukkan kepekatan Cu dalam batuan syal meningkat seiring dengan peningkatan oksida besi.

Nilai Pb dalam batuan syal tidak menunjukkan sebarang hubungan dengan Cr dan Cu. Sebaliknya, Cr didapati berkorelasi positif signifikan dengan Cu. Hubungan tersebut menunjukkan taburan Pb dalam batuan syal tidak dipengaruhi oleh faktor yang mengawal taburan Cr dan Cu.

Jadual 3 Jadual korelasi antara unsur major dengan Pb, Cr dan Cu dalam batuan dan tanah syal di Ladang United Pillai (N=40)

UNSUR MAJOR/ LOGAM BERAT	Batuan syal			Tanah syal		
	Pb	Cr	Cu	Pb	Cr	Cu
SiO ₂	-0.030	-0.852*	-0.288	-0.697*	-0.819*	-0.812*
TiO ₂	0.017	0.632*	-0.238	0.611*	0.502*	0.805*
Al ₂ O ₃	-0.023	0.721*	-0.125	0.698*	0.715*	0.762*
Fe ₂ O ₃	0.029	0.628*	0.602*	0.738*	0.861*	0.843*
MnO	0.229	0.716*	0.176	-0.583*	-0.471	-0.476*
MgO	0.225	0.334	-0.404	0.489	0.706*	0.628*
CaO	0.072	-0.344	-0.125	TD	TD	TD
Na ₂ O	0.176	0.390	0.248	0.601*	0.494	0.456*
K ₂ O	0.303	0.358	-0.414	-0.640*	-0.715*	-0.742*
P ₂ O ₅	0.096	0.334	-0.025	0.430	0.495	0.600*
Pb	1.000	-0.081	-0.338	1.000	0.674*	0.629*
Cr	-0.081	1.000	0.534*	0.674*	1.000	0.874*
Cu	-0.338	0.534*	1.000	0.629*	0.874*	1.000

* Korelasi signifikan ($P < 0.05$) antara unsur-unsur major dengan Pb, Cr dan Cu.

Tanah syal Formasi Mahang

Tanah syal Formasi Mahang berwarna kuning kecoklatan hingga kemerahan. Hasil ujian XRD menunjukkan mineral dalam tanah syal terdiri daripada kuarza, muskovit dan kaolinit. Beberapa unsur major iaitu Al₂O₃, K₂O, MgO dan TiO₂ menunjukkan pengayaan manakala SiO₂ pula mengalami penyusutan. Kandungan Fe₂O₃ pula didapati tidak berbeza secara signifikan berbanding dengan batuan induknya.

Taburan Pb, Cr dan Cu dalam tanah syal Formasi Mahang

Tanah syal Formasi Mahang mempunyai kepekatan Pb lebih rendah berbanding batuan induknya iaitu sebanyak 35 µg/g. Pb dalam tanah syal didapati berasosiasi dengan mineral lempung dan oksida Fe dan Al berdasarkan korelasinya yang positif signifikan ($P < 0.05$) dengan Al₂O₃ dan Fe₂O₃. Dalam tanah syal, kepekatan Cr menunjukkan peningkatan iaitu sebanyak 108 µg/g. Nilai Cr juga berkorelasi positif signifikan ($P < 0.05$) dengan Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂ dan MgO. Hubungan tersebut menunjukkan terdapat asosiasi di antara Cr dengan komponen unsur major yang membentuk mineral filosilikat (Al₂O₃, TiO₂, MgO), mineral lempung (Al₂O₃) dan oksida besi (Fe₂O₃).

Kepekatan Cu dalam tanah syal tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dengan batuan induknya iaitu sebanyak 39 µg/g. Nilai Cu menunjukkan hubungan positif signifikan dengan Al₂O₃ dan Fe₂O₃. Sebaliknya, Cu berkorelasi negatif signifikan

dengan SiO₂, K₂O, MgO dan TiO₂. Ini menunjukkan taburan Cu dalam tanah syal tidak dipengaruhi oleh komponen unsur major yang membentuk mineral kuarza (SiO₂) dan mineral filosilikat (K₂O, MgO dan TiO₂).

Kajian ini mendapati, kepekatan Pb, Cr dan Cu dalam tanah syal berkorelasi positif signifikan di antara satu sama lain (Jadual 3). Ini menunjukkan Pb, Cr dan Cu dalam tanah syal cenderung untuk tertabur bersama-sama.

4. Perbincangan

Dalam batuan syal Formasi Mahang, Pb, Cr dan Cu didapati berasosiasi dengan komposisi kimia yang berlainan dalam batuan tersebut. Kepekatan Pb tidak tertumpu secara khusus dalam mana-mana mineral seperti kuarza, mineral filosilikat ataupun oksida besi. Sebaliknya ia tertabur secara rawak di dalam batuan syal. Ia cenderung untuk terhimpun dalam beberapa sampel batuan syal merah yang mengandungi pemendakan amorf manganese oksida yang tinggi. Asosiasi di antara Pb dengan bintil manganese oksida berlaku secara tabii iaitu sewaktu pengendapan sedimen di laut dalam (Chester & Hughes 1967; Salomons & Förstner 1984). Menurut Salomons & Förstner (1984), pengelompokan Pb bersama-sama bintil manganese boleh berlaku secara penjerapan ion logam daripada air laut (hidrogenus), pergerakan semula ion logam daripada turus sedimen (diagenetik), pengangkutan ion logam daripada sedimen atau batuan dasar akibat pemanasan oleh aktiviti gunung berapi (hidroterma) dan luluhlarut

bahan piroklas oleh air laut (halmirolitik). Kepekatan Pb dalam tanah syal didapati menyusut kerana ia telah terbebas ke alam sekitar apabila batuan syal dan pemendakan manganese oksida mengalami luluhawa dan terurai. Ini ditunjukkan oleh peratusan MnO yang kecil (<0.1%) dalam tanah syal. Pb kemudiannya berasosiasi dengan oksida Fe dan Al dan mineral lempung berdasarkan korelasinya yang baik dengan Fe₂O₃ dan Al₂O₃.

Dalam batuan syal, Cr didapati tertabur dalam kekisi mineral filosilikat. Ini ditunjukkan oleh korelasi positif signifikan di antara Cr dengan unsur-unsur major pembentuk mineral filosilikat iaitu Al₂O₃, TiO₂, K₂O dan MgO (Tebbens *et al.* 2000). Mineral filosilikat tertabur di bahagian matriks, iaitu di antara butiran kuarza dan oksida besi. Cr juga didapati tertabur bersama-sama dengan oksida besi berdasarkan korelasinya yang baik dengan Fe₂O₃. Kepekatan Cr lebih tinggi dalam batuan syal merah kerana ia mengandungi peratusan Fe₂O₃ yang banyak berbanding dengan syal kelabu. Cr cenderung untuk termendak bersama-sama dengan ferik oksida sewaktu pengendapan sedimen di sekitaran laut dalam (Chester & Hughes 1967). Apabila batuan terluluhawa, Cr mengalami pengayaan. Ia didapati berasosiasi dengan mineral filosilikat, mineral lempung dan oksida besi. Keputusan XRD menunjukkan tanah syal terdiri daripada kuarza, muskovit dan kaolinit. Kajian oleh Islam *et al.* (2002) mendapati muskovit dan mineral lempung (kebanyakannya ilit) bertukar menjadi kaolinit apabila batuan sedimen mengalami luluhawa di kawasan beriklim subtropika dan tropika. Luluhawa batuan sedimen dalam Formasi Semantan pula menunjukkan perubahan klorit, ilit dan muskovit menjadi kaolinit (Kamal Roslan *et al.* 1990). Pertukaran muskovit menjadi kaolinit tidak dapat dipastikan dengan jelas dalam kajian ini kerana kandungan kedua-dua mineral tersebut dalam tanah dan batuan syal hampir sama banyak. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh sifat muskovit yang lebih tahan terhadap luluhawa berbanding dengan ilit dan klorit (Islam *et al.* 2002).

Dalam batuan syal, Cu hadir bersama-sama dengan mendakan ferik oksida. Ini ditunjukkan oleh korelasi yang baik di antara Cu dan Fe₂O₃. Kandungan Cu juga lebih tinggi dalam batuan syal merah yang mengandungi peratusan Fe₂O₃

berbanding dengan batuan syal kelabu. Kepekatan Cu dan Fe₂O₃ dalam tanah syal tidak berbeza secara signifikan berbanding dengan batuan induknya. Secara umum, batuan syal Formasi Mahang mengandungi jumlah ferik oksida yang tinggi. Luluhawa kimia di kawasan kajian tidak banyak mengubah jumlah oksida besi dalam batuan kerana ia tahan terhadap luluhawa. Dalam tanah syal, Cu berasosiasi dengan laterit iaitu bintil-bintil ferik oksida yang tertabur di dalam tanah. Kajian oleh Xie & Dunlop (1998) dan Cairns *et al.* (2001) menunjukkan Cu cenderung untuk berasosiasi dengan bahan berbesi (*ferruginous material*) seperti goetit, hematit dan maghemit. Cu yang berasosiasi dengan ferik oksida dalam batuan syal tidak terbebas setelah batuan terluluhawa. Sebaliknya ia berkumpul dan mengalami pemekatan dalam bintil-bintil ferik oksida yang membentuk laterit di kawasan kajian. Sebahagian daripada Cu juga didapati berasosiasi dengan mineral lempung.

5. Kesimpulan

Taburan Pb dan Cu dalam batuan syal Formasi Mahang di kawal oleh proses pembentukannya iaitu sewaktu pengendapan sedimen di persekitaran laut dalam. Pb cenderung untuk berasosiasi dengan manganese oksida manakala Cu pula dengan ferik oksida. Ini bermakna, batuan yang mempunyai peratusan MnO dan Fe₂O₃ yang banyak seperti syal merah mengandungi kepekatan Pb dan Cu yang lebih tinggi berbanding dengan syal kelabu. Dalam batuan syal, Cr lebih tertumpu dalam kekisi mineral filosilikat dan oksida besi. Setelah batuan terluluhawa, Pb yang terbebas daripada batuan telah berasosiasi dengan oksida Al dan Fe serta mineral lempung. Cr pula berasosiasi dengan mineral filosilikat, mineral lempung dan oksida Fe dan Al. Cu mengalami pemekatan dalam bintil-bintil laterit yang banyak tertabur dalam tanah syal di kawasan kajian.

6. Penghargaan

Penghargaan diberikan kepada Prof. Madya Dr. Anizan Isahak atas sumber kewangan (geran penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia 2/99) ketika menjalankan kerjalapangan.

7. Rujukan

Alloway, B. J. 1995. *Heavy metals in soils*. Ed. ke-2. London: Chapman & Hall.

- Cairns, C. J., McQueen, K. J. & Leah, P. A. 2001. Mineralogical controls on element dispersion in regolith over two mineralized shear zones near the Peak, Cobar, New South Wales. *Journal of Geochemical Exploration*. 72: 1-21.
- Chester, R. & Hughes, M. J. 1967. A chemical technique for the separation of ferro-manganese minerals, carbonate minerals and adsorbed trace elements from pelagic sediments. *Chemical Geology*. 2: 249-262.
- Habibah, J. & Wan Fuad, W. H. 2002. Komposisi unsur surih dan major di sepanjang profil luluhawa Formasi Mahang di Sungai Merbok, Kedah. *Pro. Annual Geological Conference 2002*, hlm. 59-63.
- Islam, M. R., Lahermo, P., Salminen, R., Rojstaczer, S. & Peuraniemi, V. 2000. Lake and reservoir water quality affected by metals leaching from tropical soils, Bangladesh. *Environmental Geology*. 39(10): 1083-1089.
- Jones, C. R. 1973. lower Paleozoik. Dlm. Gobbett, D. J. & Hutchison, C. S. (pynt.). *Geology of the Malay Peninsula*, hlm. 25-60. New York: Wiley-Interscience.
- Kamal Roslan, M., Che Aziz, A., Uyop, S., Kadderi, M. D. & Ibrahim, K. 1990. Formaasi Semantan: aspek geologi kejuruteraan. *Proc. Sains Bumi dan Masyarakat*, hlm. 63-80.
- Norrish, K. & Hutton, J. T. 1969. An accurate X-ray spectrographic method for the analysis of a wide range of geological samples. *Geochim. Cosmochim. Acta* 33: 431-453.
- Perkhidmatan Kajicuaca Malaysia. 1996. *Ringkasan tahunan pemerhatian kajicuaca 1996*.
- Rose, A. W. Hawkes, H. E. & Webb, J. S. 1979. *Geochemistry in mineral exploration*. (Ed. ke-2). London: Academic Press.
- Salomons, W. & Förstner, U. 1984. *Metals in hydrocycle*. Berlin: Apringer-Verlag.



Isolasi Senyawa Flavon Dari Tumbuhan *Cryptocarya Costata* (Lauraceae)

Hanapi Usman[†], Euis H.Hakim[‡], Sjamsul A.Achmad[‡], Tjodi Harlim[†], M.Noor Jalaluddin[†],
Yana M. Syah[‡], Lia D.Juliawati[‡], Lukman Makmur[‡], Mariko Katajima[§]

[†] Departemen Kimia Universitas Hasanuddin Makassar, Jalan Perintis Kemerdekaan Km.10, Makassar, Indonesia.

[‡] Kelompok Peneliti Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10 Bandung, Indonesia.

[§] Center for Medicinal Resources, faculty of Pharmaceutical, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku Ciba 263, Japan

Abstrak

Suatu flavanon telah diisolasi dari kulit batang *Cryptocarya costata*. Isolat diperoleh dari fraksi kloroform, setelah fraksinasi dengan teknik kromatografi yang dilanjutkan dengan rekristalisasi dalam heksan dan etilasetat, dihasilkan kristal jarum berwarna kuning dengan titik leleh 153-155°C, dengan putaran optik - 4. Elusidasi struktur isolat berdasarkan spektrum ultra violet, inframerah, massa dan resonansi magnet inti, maka dapat ditetapkan bahwa senyawa isolat adalah 7-hidroksi-5,6,8-trimetoksi flavanon.

Kata kunci : flavanon, *Cryptocarya costata*

1. Pendahuluan

Cryptocarya adalah salah satu genus dari famili Lauraceae yang mempunyai sekitar 478 spesies (Konstermans, 1957). Tumbuhan ini hidupnya tersebar luas di daerah tropika atau sub tropika dengan topologi berupa pohon tinggi, oleh karenanya sejak dahulu kelompok tumbuhan ini banyak digunakan sebagai bahan bangunan, bahan baku pulp, dan beberapa di antaranya kemudian digunakan sebagai obat tradisional. Bahkan akhir-akhir ini beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa *Cryptocarya* mengandung senyawa kimia berguna. Collins (1990) melaporkan bahwa sebagian besar dari spesies *Cryptocarya* mengandung molekul kimia anti tumor.

Cryptocarya costata diidentifikasi sebagai tumbuhan primitif dan langka, ditemukan di kawasan hutan Sulawesi yang dikenal sebagai kawasan Wollacea. Berdasarkan penelusuran literatur diketahui bahwa tumbuhan ini belum pernah ditemukan orang di kawasan lain,

berarti kandungan kimianya pun belum pernah diselidiki orang. Di Sulawesi tumbuhan ini dikenal dengan nama daerah Tarusu (Bugis), Garate Borong (Makassar), Baga Tomombu (Keli).

Penelitian terhadap *Cryptocarya costata* tersebut, menggunakan serbuk kulit batang yang diekstrak dengan metanol lalu dipartisi dengan kloroform. Karakterisasi sifat fisikokimia isolat, selanjutnya elusidasi struktur berdasarkan spektrum UV, IR, MS dan ¹H-NMR, ¹³C-NMR yang didukung oleh data FGHMBC dan FGHMQC maka diketahui bahwa senyawa isolat adalah satu flavanon.

2. Percobaan

Umum. Penentuan titik leleh dilakukan menggunakan 'micro melting point apparatus'. Spektrum UV dan IR diukur menggunakan Cary Varian 100 Conc. dan Perkin Elmer Spectrum one FT-IR spectrophotometers. Spektrum massa diukur dengan instrumen Jeoln

Tabel 1. Data NMR senyawa isolat

No	δ_H	δ_C
1	-	-
2	5,45 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,0$ & $13,0$)	79,4
3	3,02 (1H _{ax} <i>dd</i> , $J = 3,08$ & $16,8$) 2,86 (1H _{eq} <i>dd</i> , $J = 3,0$ & $16,8$)	45,9
4	-	189,4
4a	-	108,9
5	-	149,7
6	-	135,7
7	-	149,2
8	-	131,8
8a	-	151,8
1'	-	138,7
2'/6'	7,48 (1H, <i>d</i>)	125,9
3'/5'	7,44 (1H, <i>d</i>)	128,7
4'	7,36 (1H, <i>d</i>)	128,6
5-OCH ₃	3,91 (3H, <i>s</i>)	61,6
6-OCH ₃	3,93 (3H, <i>s</i>)	61,3
7-OH	6,30 (1H, <i>s</i>)	-
8-OCH ₃	3,92 (3H, <i>s</i>)	61,5

GC mate, dan ¹H (500 MHz) dan ¹³C (125 MHz) NMR spektrofotometer Jeol.

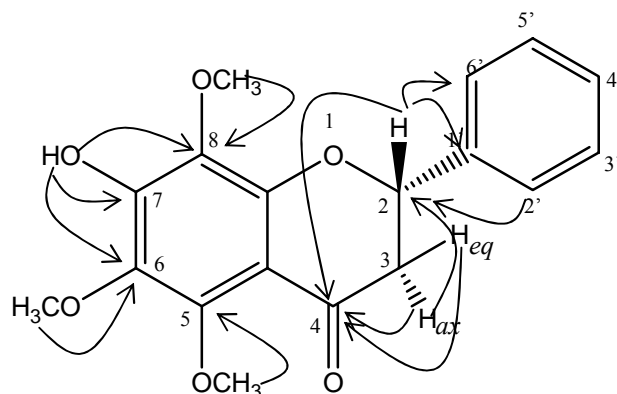
Bahan Tumbuhan. Bagian tumbuhan yang digunakan adalah kulit batang *Cryptocarya costata*, yang didapatkan dari hutan taman nasional Lore Lindu, desa Tomodo, kec. Kulawi Sulawesi tengah. Identifikasi dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bogor.

Ekstraksi dan Isolasi. Sebanyak 2,5 Kg. serbuk halus kulit batang *Cryptocarya costata* dimaserasi dengan metanol, kemudian dipartisi dengan kloroform. Selanjutnya, fraksi kloroform dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 140 g. Sebanyak 20 g. ekstrak tersebut difraksinasi menggunakan kromatografi kolom cair (KVC) dengan eluen campuran antara n-heksan : etilasetat (9 : 1 s/d 6 : 4). Didapatkan enam fraksi, yakni fraksi A, B, C, D, E dan F. Fraksi Fsangat dominan berat 2,5 g. Penelusuran lebih lanjut dilakukan

terhadap farksi F Sebanyak 400 mg. fraksi F diolah dengan kromatografi radial diperoleh komponen utama berupa padatan berwarna kuning kecoklatan sebanyak 305 mg. setelah dilakukan rekristalisasi berulang-ulang dengan menggunakan kombinasi pelarut n-heksan dan etilasetat, maka dihasilkan kristal berwarna kuning sebanyak 295 mg. Uji TLC dengan tiga sistem pelarut menunjukkan masing-masing satu noda, uji titik leleh menunjukkan tl 153 – 155 °C.

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa dari fraksi F, didapatkan dalam bentuk kristal berwarna kuning, dengan tl. 153 – 155 °C, uji TLC dengan tiga sistem pelarut masing-masing menunjukkan hanya ada satu noda. Data fisikokimia tersebut di atas menunjukkan bahwa senyawa F yang dihasilkan sudah cukup murni. Spektrum UV dalam metanol menunjukkan serapan maksimum pada 217, 286 dan 336, penambahan NaOH



Gambar 1. Korelasi signifikan HMBC senyawa isolat

menunjukkan adanya pergeseran batokromik yakni pada serapan 208, 253 dan 339, gejala tersebut menunjukkan indikasi senyawa flavanon. Spektrum IR menunjukkan adanya gugus $-OH$ pada serapan 3328 cm^{-1} dan CO pada 1668 cm^{-1} disamping adanya metil dan metilen yang ditunjukkan lewat $2978, 2940$ dan 2836 cm^{-1} dan aromatik ditunjukkan pada $1586, 1473, 1422\text{ cm}^{-1}$. Data spektrum 1H NMR sebagaimana terantum pada (tabel 1), indikasi terhadap flavanon terlihat pada (δ_H 5,46, *dd*, 3,02, *dd* dan 2,86 *dd*), hal ini didukung oleh data UV. Sinyal untuk (δ_H 3,93, 3,92 dan 3,91 *s*) integrasi menunjukkan 9 proton pada tiga gugus OCH_3 . Satu proton dari OH fenolik terlihat pada (δ_H 6,30 *s*). Spektru ^{13}C NMR sebagaimana (tabel 1) menunjukkan adanya 18 karbon, identifikasi terhadap sinyal-sinyal yang muncul, menunjukkan (δ_C 189,4) untuk karbon karbonil, tiga karbon pada OCH_3 (δ_C 61,3, 61,5 dan 61,6). Lima karbon pada gugus fenil cincin B flavanon 2'/6', 3'/5' dan 4' (δ_C 125,8., 128,7. dan 128,5), masing-masing satu karbon pada (δ_C 79,4 dan δ_C 45,9) untuk C-2 dan C-3 flavanon. Lima karbon tertier pada cincin A, yaitu 5, 6, 7, 8, 8a (δ_C 149,7, 135,7., 149,2., 131,8, dan 151,8), dan karbon kuartener 4a dan 1' pada (δ_C 108,9 dan 138,7). Hal tersebut diperkuat dengan spektrum massa yang menunjukkan bahwa senyawa isolat mempunyai rumus empiris $C_{18}H_{18}O_6$ dengan $[M^{+1}]^+ m/z = 331$, dengan puncak-puncak fragmentasi terlihat pada berturut-turut ($m/z = 69, 77, 103, 127, 165, 183, 211, 226$ puncak dasar dan 330).

4. Kesimpulan

Berdasarkan interpretasi dari seluruh data yang didapatkan sebagaimana diuraikan di atas, maka

ditetapkan bahwa senyawa isolat yang didapatkan adalah jenis flavanon, yakni 7-Hidroksi-5,6,8-trimetoksi flavanon. Senyawa tersebut pertama kalinya ditemukan dalam tumbuhan *Cryptocarya*.

5. Daftar Pustaka

- Ahmad, S.A. 2004. Empat Puluh Tahun Dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuh-tumbuhan Tropika Indonesia, Rekoleksi dan Prospek. *Bulletin of The Indonesian Society of Natural Products Chemistry*. Vol.4, No.2. 5 – 54.
- Achmad, A.S., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Syah, Y.M. 1994. Chemical Studies of Indonesian Reinfrest Plant : Triterpenoids from *Cryptocarya crassinervia* and *Litsea elleptica*. *Rep. Asahi Glass Found.*
- Achmad, S.A., Syah, Y.M., Hakim, E.H., Makmur, L. 1993. Alkaloid Constituents of *Persea Rimosia (Bl)* Kosterm and their Significance to the Chemosytematic of Family Lauraceae. *Biotrop Spec. Publ.* No. 51.
- Achmad S.A., Azminah, Effendy, Ghisalberty, E.L., White, A.H. 1992. Structural Studies of two Bioactive Furanosesquiterpenes from *Cryptocarya densiflora*. *Aust. J. Chem.* 45, 445-450.
- Ahmad, S.A., Effendi, Ghisalberty, E.L., Hakim, E.H., Juliawati, L.D., Makmur, L., White, A.H. 1991. Ilmu Kimia Tanaman Lauracea Indonesia VI ; Kriptokaryon dari *Cryptocarya Laevigata* Bl. *Proceedings ITB*. Vol. 24, No. 213
- Bick, I.R.C., Sinchai, W. 1978. Alcaloides of the Lauraceae. *Heterocyclic*, Vol. 9, No.7, 903-941.
- Bick, I.R.C., Sevenet, T., Sinchai, W., Skelton, B., White Allen H. 1981. Alcaloids of *Cryptocarya longifolia*. *Aust. J. Chem.* 34 (1), 477 – 481

- Bishara, R.H., Schiff, P.L. 1970. The isolation of Some Sterols and Protocatheic acid from *Cryptocarya faveolata*. *Lyodia*, 33 (4), 477-481.
- Bisset, N.G. 1955. *A Phytochemical Survey of Some Plants from the South Moluccas*, Treub Laboratory, Kebun Raya Bogort, 125.
- Collins, D.J., Culvenor, C.C.J., Lambertson, J.A., Loder, J.W., Price, J.R. 1990. *Plants for Medicine*. CSIRO, Melbourne, Australia.
- Dumontet, V., Hung, N.V., Adeline, M.T., Riche, C., Chiaroni, A., Seven, T. and Gueritte, F. 2004. Cytotoxic Flavonoids and α -pyrones from *Cryptocarya obovata* *J. Nat. Prod.* 67, 858 - 862
- Fu, X., Sevenet, T., Remy, F., Pais, M., Hadi, A.H., Zeng, L.M. 1993. Flavanone and Chalcone derivatives from *Cryptocarya kurzii*. *J. Nat. Prod.* 56 (7), 1153 - 1163.
- Gellert, E.1959.The Constituents of *Cryptocarya pleurosperma*. *Aust.J.Chem.*22, 90 – 96.
- Gottlieb,O.R.1972.Chemosystematik of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 11, 1537 – 1570.
- Gottlieb, O.R. 1985. *Micromolecular Evolution, Systematics an Ecology*. Berlin Heidelberg. New York.
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Buchari dan Pramutadi, S. 1994. Ilmu Kimia Tumbuhan Lauraceae Indonesia X ; Alkaloid Benzeilisokuinolin dari *Litsea Cassiaefolia*. *Proceedings ITB*. Bandung Vol.27, No.3.
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Buchari dan Pramutadi, S. 1994. Ilmu Kimia Tumbuhan Lauraceae Indonesia, XI; Alkaloid Aporfina dan Oksoaporfina dari *Litsea Excelsa*. *Proceedings ITB*. Bandung Vol.27, No.3.
- Hakim, E.H., Achmad, S.A. 1991. Isolation of Actinodaphnine from *Litsea Diversifolia*. *ACGC Chem. Res. Comm.* 1.(1).
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Effendy, Ghisalberti, E.L., White, A.H. 1993. Structural Studies of Three Sesquiterpenes from *Litsea* sp. *Aust. J.Chem.*, 46. 1355-1362.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Yayasan Sarana Wanajaya, Jakarta.
- John, R.J. 1987. *The Flowering Plants of Papua, Dicotyledone Part 1*. Forestry Departement, Papua New Guinea, hal 87
- Joseph, H., Dori, J. L., Sterling, J.T., Jack R.C. 1978. Cryptopleurine, cytotoxic agent from *Boehmeria caudata* (Urticaceae) and *Cryptocarya laevigata* (Lauraceae). *Phytochemistry*, 17(8), 1448.
- Juliawaty, L.D., Kitajima, M., Tokayama, H., Ahmad, S.A., Aimi Norio. 2000. 6-Substituted-5,6-dihydro-2-pyrone from *Cryptocarya Strictifolia*. *Phytochemistry*. 54, 989 – 993.
- Juliawaty, L.D., Kitajima, M., Tokayama, H., Achmad, S.A., Aimi Norio. 2000. A New Type of Stilbene-Related Secondary Metabolite Indenburgene from *Cryptocarya Indenburgensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 11, 1726-1728.
- Juliawaty, L.D., Achmad, S.A., Makmur, L., akim, E.H. 1993. Investigation of the Chemical Constituent of *Cryptocarya Laevigata Bl* and *Cryptocarya Nutans* and its Relation to the Taxonomy of Lauracea. *Biotrop Spec.Publ.No.*23, 1-9
- Juliawaty, L.D., Kitajima, M., Takayama, H., Achmad, S.A., Aimi, N. 2000. A new type of stilbene related secondary metabolite, idenburgene, from *Cryptocarya idenburgensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 48(11), 1726-1728.
- Kostermans, A.J.G.H. 1957. *Lauraceae*. Comm. Forest Res. Inst. Indonesia, 57, 1-64.
- Lee, S.S., Chen, C.H., Liu, Y.C. 1990. Neocaryachine, a new pavine alkaloid from *Cryptocarya chinensis*, and NMR spectral properties of related alkaloids. *Journal of Natural Products*. 53(5), 1267-71.
- Lee, S.S., Chen, C.H., Liu, Y.C., 1993. Additional alkaloids from *Cryptocarya chinensis* *Pharm. Journal of Natural Products*, 56 (2), 227-32.
- Lin, F.W., Wang, J.J., Wu, T.S. 2002. New pavine N-oxide alkaloids from the stem bark of *Cryptocarya chinensis* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50 (2), 157-159.
- Lin, L.F., Wu, T.S., Wu, T.S. 2001. Alkaloids from the leaves of *Cryptocarya chinensis* *Hemsl. Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49 (10), 1292-1294.
- Michael, L., Anissa, R., Andre, C., Henri, M. 1989. Velucryptine, a new isoquinoline alkaloid from *Cryptocarya velutinosa*. *Journal of Natural Products* 52 (3), 516-521.
- Michael, L., Andre, C., Anissa, R., Henri, M 1989, Cryptowolinol and cryptowolidine, new dibenzopyrrocoline type alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry*. 67(5), 947-952.
- Saad, J.M., Soepadamo, E., Fang, X.P., Mc. Laugglin, J.L. 1991. (-) Grandisin from *Cryptocarya crassinervia*. *J.Nat. Prod.*, 54 (6), 1681-1683.

**Hanapi Usman, Euis H.Hakim, Sjamsul A.Achmad, Tjodi Harlim, M.Noor Jalaluddin, Yana M. Syah,
Lia D.Juliawati, Lukman Makmur. Mariko Katajima**

Wu, T.S., Lin, F.W. 2001. Alkaloids of the wood of *Cryptocarya chinensis*. *Journal of Natural Products* 64 (11), 1404-1407.

X-ray crystallography and biological properties nitrobenzoylhydrazone with Zinc, Nickel, Cadmium and Copper Complexes.

Hapipah Mohd Ali¹, Siti Nadiyah Abdul Halim¹, Nurul Fadhilah K. Aripin¹, Wan Jefri Basirun¹, Sharifudin M. Zain¹, Endom Ismail², Nordin Hj Lajis³, Bohari M. Yamin² and Seik Weng Ng¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia,

²School of Chemical Sciences and Food Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia.

³Laboratory of Natural Products, Institute of BioScience, University Putra Malaysia, 43400, Serdang, Selangor.

hapipahali@yahoo.com, Fax: 603-79674193.

Abstract

The new zinc(II), nickel(II), cadmium(II) and copper complexes have been prepared in ethanol by template condensation of 4-nitrobenzhydrazide, 5-chloro-2-hydroxyacetophenone with metal acetate in the presence of triethylamine. The x-ray crystallographic study of Ni(II) complex of 5-chloro-2-hydroxyacetophenone 4-nitrobenzoylhydrazone is monomeric while Cd(II) and Cu(II) are dinuclear complexes with a center of inversion. Both (Ni(II) and Cd(II) complexes display distorted octahedral geometry around the central metal atoms with solvent of recrystallization, pyridine molecules occupying both axial and equatorial positions. The Cu(II) complex adopts square planar geometry. Each metal atom is chelated to ONO atoms of the Schiff base ligand in a tridentate manner. The phenolic hydroxyl O-atom functions as a bridging site to furnish the dinuclear Cd(II) complex. The dimeric hydrazone is not commonly encountered and represents the early examples of the dinuclear species. The Schiff base ligands are essentially planar and the structural dimensions are in normal range. The IR, and UV spectra of ligand and complexes were also obtained. The cyclic voltammetry of the nickel complexes exhibited irreversible oxidation process. The Schiff base ligand, LNO₂Cl was more sensitive towards the MCF-7 cells (human breast cancer cells) with IC₅₀ values of 4.5 µg ml⁻¹ than the unsubstituted ligand, HapBh. The nitro and chloro-substituents might have contributed to a marked increase in the cytotoxicity of the ligand. However on coordination to nickel, the activity has reduced to the same level as the positive control drug, tamoxifen. The antioxidant properties of the Schiff base ligand (using the FTC method) exhibited higher activity than vitamin E or Quercetin. However the activity is lower than the unsubstituted Schiff base ligand or the commercial antioxidant agent, BHT (butylated hydroxytoluene).

Keywords: Schiff bases, metal complexes, x-ray structure, antioxidant activity and cytotoxicity.

1. Introduction

Schiff base ligands based on hydrazones and their complexes have received considerable attention because of their pharmacological properties such as antibacterial and anticancer agents [1]. In previous work, we had isolated some Zn(II) complexes of substituted benzoylhydrazones, the x-ray structures and their cytotoxicity and antioxidant properties of

these complexes had been investigated [2-5]. The nickel(II) analogues, [Ni(bhac)(Hdmpz)] and [Ni(bhac)(Himd)] were isolated when nickel salt was reacted with acetylacetone benzoylhydrazone and dimethylpyrazole (Hdmpz) or the imidazole (Himd) [6]. The x-ray structure of these Ni(II) complexes indicated that nickel ions are in square planar with N₂O₂ geometry assembled via enolate-O,

imine-N and amide-O. The Zn(II) and Cd(II) complexes of hydrazone are rare and only a few examples were reported. With the aim in participating further in this research field, we have synthesized the substituted benzoylhydrazone-hydroxyacetophenone ligands and determine their coordination to metal atoms to nickel and cadmium. The effect of substituents on the cytotoxicity and antioxidant activity of the ligands and the complexes are investigated.

2. Experimental section

All reagents were commercially available from Fluka or Aldrich and were used without further purification.

2.1 Ligand

The Schiff base ligand was prepared by condensation of ethanolic solution of 4-nitrobenzhydrazide with equimolar amounts of either 5-chloro-2-hydroxyacetophenone. The structure of the ligand is depicted in Fig.1.

The complexes were synthesized by stirring

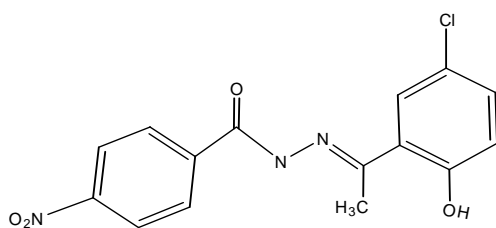


Fig.1: 5-chloro-2-hydroxyacetophenone 4-nitrobenzoylhydrazone

and refluxing of the Schiff base ligand with metal acetate in ethanol in the presence of triethylamine for 5 hours. The dark red solid was filtered and recrystallized from pyridine.

2.2. Bioactivity

Cytotoxicity activity was evaluated at Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor.

2.2.1. Culture of cells and cytotoxic assay

Cytotoxicity Assay

The technique used was described by Freshney [7] with some modification.

MCF-7 (human breast cancer cells) were seeded into 96 well plates at an initial cell density of approximately 5×10^5 cells cm^{-3} . After 24 hours incubation for cell attachment

and growth, the medium was removed and replaced with fresh medium containing varying concentrations of organic compounds. The compounds added were first dissolved in DMSO at the required concentration. Subsequent 6 desirable concentrations was prepared using growth medium. Control wells received only DMSO. Each concentration of the compound under study was assayed in six replicates. The assay was terminated after 24 hours incubation period. Again, the medium was removed and the cell viability was determined after further 4 hours incubation with 5 mg cm^{-3} MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] bromide; also named as thiazol blue). DMSO was then added per well and the dissolving formazan precipitate was read by using elisa plate reader, Dynatech MR5000 at 570 nm. For comparison studies, tamoxifen was used as a positive control.

IC_{50} value is taken from the plotted graph of percentage live cells compared to control (%) versus tested concentration of compounds ($\mu\text{g cm}^{-3}$). The IC_{50} value is the concentration required for 50% growth inhibition. It represents the growth inhibitory (cytostatic) effects on cell viability of the compounds tested [8].

2.2.2 Antioxidant assay

Ferric thiocyanate (FTC) method

The antioxidant properties were assessed at Laboratory of Natural Products, Institute of Bioscience, University Putra Malaysia, Serdang, Selangor. This assay was carried out as described in the modified method of Kikuzaki and Nakatani [9]. A mixture of 2 mg of the test sample in 4 ml of 99.5% ethanol, 4.1 ml of 2.51% linoleic acid in 99.5% ethanol, 8.0 ml of 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) and 3.9 ml of distilled water contained in screw-cap vial (\varnothing 38 x 75 mm) was placed in an oven at 40°C in the dark. To measure the extent of antioxidant activity, 0.1 ml of the reaction mixture was transferred to a test tube ($\varnothing = 13$, $h = 150$ mm) and followed by addition of 9.7 ml of 75% (v/v) aqueous ethanol, 0.1 ml of 30% aqueous ammonium thiocyanate and 0.1 ml of 0.02 M ferrous chloride in 3.5% hydrochloric acid. Three min after the addition of ferrous chloride to the reaction mixture, the absorbance of red colour (conversion to Fe^{3+})

Table 2: Selected IR bands for ligands and complexes in cm^{-1} .

Compounds	OH of H ₂ O	OH of PhOH	N-H	C=O	C=N	C-OH	N-N	M-O	M-N
LNO ₂ Cl	3404	-	3233	1655	1602	1290	1051	-	-
[Zn(LNO ₂ Cl)]									
[Ni(LNO ₂ Cl)(py) ₃]	3431	-	-	-	1590	-	1082	590	437
[Cd(LNO ₂ Cl)(py) ₂] ₂	3432	-	-	-	1527	-	1071	588	525
[Cu(LNO ₂ Cl)(DMSO)] ₂									

Table 3 : Assignments of UVvis spectra

Compounds	Absorption (λ_{max})	Assignment
LNO ₂ Cl	340	$n - \pi^*$ and $\pi - \pi^*$
[Zn(LNO ₂ Cl)]		
[Ni(LNO ₂ Cl)(py) ₃]	439	$\pi - \pi^*$
	304	$\pi - \pi^*$
[Cd(LNO ₂ Cl)(py) ₂] ₂	452	$\pi - \pi^*$ with characters of $n - \pi^*$
	311	$\pi - \pi^*$
[Cu(LNO ₂ Cl)(DMSO)] ₂		

was measured at 500 nm. The measurement was taken every 24 h interval one day after absorbance of the control reached its maximum value.

3. Results and Discussions

The Ni(II) and Cd(II) complexes are red-brown in colour, non-hygroscopic and stable in air. They are insoluble or sparingly soluble in common organic solvents and quite soluble in DMSO and pyridine. All the complexes melt over 250 °C.

3.1. IR Spectra

The IR spectra of the complexes when compared to that of free ligands show that the $\nu(\text{N-H})$ of the free ligand disappears in the spectra of the complexes supporting deprotonation of the ligand upon complex formation. The $\nu(\text{C=O})$ bands of the free ligand also disappears in the spectra of the complexes indicating destruction of the keto group presumably *via* enolisation of the ligands and facilitates the formation of metal complexes. The ligands also showed strong band at 1602 cm^{-1} which are assigned as the $\nu(\text{C=N})$ bands. In the metal complexes, this stretching band has shifted to lower frequencies, due to the lowering of the $\nu(\text{C=N})$ bond order as a result of metal-nitrogen bond formation. The shifting of the $\nu(\text{N-N})$ to higher wavenumbers further support coordination of the ligand via the azomethine nitrogen atom. The $\nu(\text{C-OH})$ bands of the phenol in the Cd(II) complex has disappeared indicating coordination of OH to the metal center. The new bands at *ca.* 590 and

430 cm^{-1} are tentatively assigned to $\nu(\text{M-O})$ and $\nu(\text{M-N})$ bands respectively.

3.2. UV-vis of ligands and complexes

UV spectra of all studied compounds are taken and assigned in DMSO. To help with the assignments, UV spectra of all the studied compounds are calculated by employing PM3 level configuration interaction calculation (single excitation). Assignments are given in table 3.

Most ligand absorption are seen to be shifted to the red upon complexation. The LNO₂Cl ligand absorption at 340nm is an $n - \pi^*$ transition based on the lone pairs of the carbonyl oxygen and the bridging nitrogen atoms with a small character of a $\pi - \pi^*$ transition.

This absorption is red shifted upon complexation to 452nm. The second transition for the Cd(II) complex is a $\pi - \pi^*$ absorption involving only the -NO₂ substituted phenyl ring.

The Ni(II) complex exhibits two $\pi - \pi^*$ transition. The first absorption (439nm) involves only the π orbitals of the phenyl ring with -NO₂ substituent. The second absorption is a more generalized $\pi - \pi^*$ transition involving the pyridine ligands.

The differences are observed in the visible spectra of the complexes compared to that of the corresponding ligand. The $\pi \rightarrow \pi^*$ transition due to the C=N chromophores has undergone bathchromic shift upon coordination *ca.* 400 nm. The $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the aromatic ring

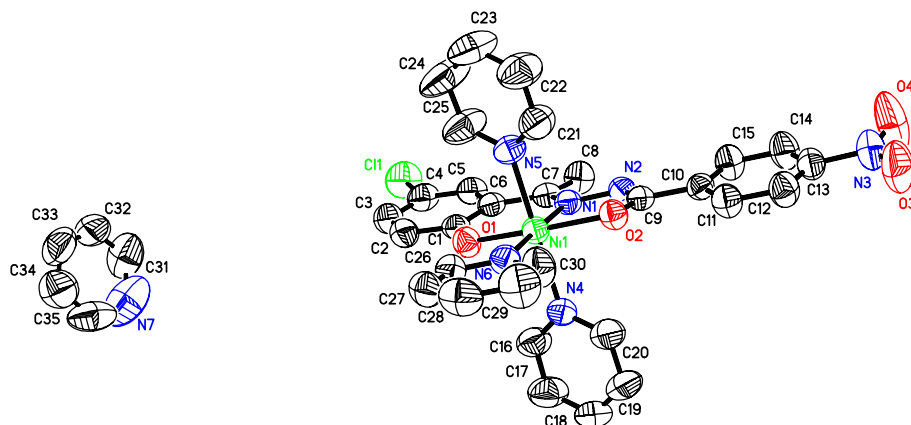


Fig.2a: [Ni(LNO₂Cl)(py)₃].py

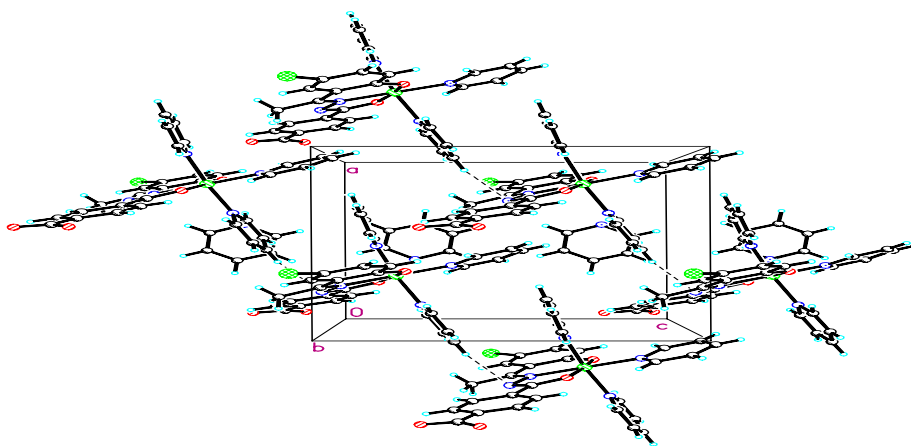


Fig.2b: Packing diagram for [Ni(LNO₂Cl)(py)₃].py

undergoes a shift to higher energy to the lower wavenumbers.

3.3. X-ray Crystallographic studies

A red-brown crystal of [Ni(LNO₂Cl)(py)₃] or [Cd(LNO₂Cl)(py)₂]₂ was mounted on a glass fiber. A summary of the crystallographic data for both complexes are summarized in Table 1. The crystal data was collected with a Bruker SMART APEX CCD diffractometer using Mo K α radiation ($\lambda=0.71073$ Å). The intensities were collected using the ω -2 θ scan mode, in the range of $2.4 < \theta < 27.0^\circ$. The structures were solved by direct methods and refined on F² by using the SHELXTL software pack.

3.3.1: (4-chloro-2-oxidophenylethylene-4-nitrobenzoylhydrazido)-tris(pyridine)nickel(II) pyridine solvate, [Ni(LNO₂Cl)(py)₃].py

The tridentate ligand fragment in the title complex is essentially planar with the pyridine ligands occupy the equatorial positions in an octahedral environment [10]. The nickel atom is chelated by the ligand in a tridentate manner via atoms O1-N1-O2. The coordination geometry of Ni1 is distorted octahedron with N4-N5 pyridine atom occupying the axial position with an angle $173.16(8)^\circ$. One pyridine molecule present as solvated species. In the crystal structure, the molecules are linked by intermolecular interactions, C18-H18A...N2ⁱ forming a polymeric chain parallel to ac face (Fig.2b).

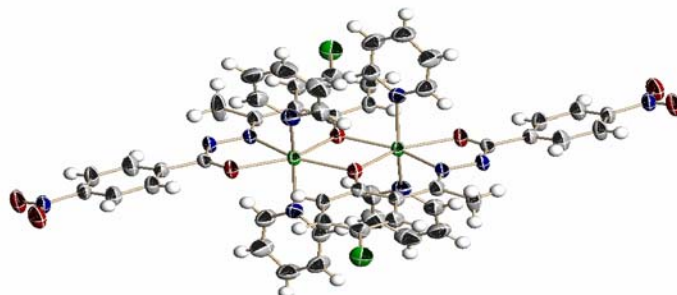
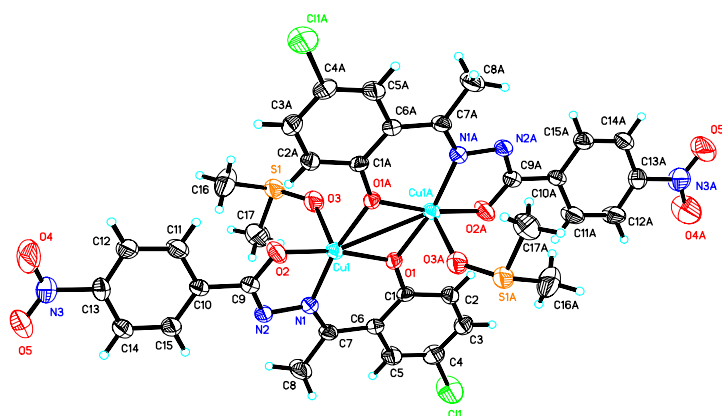


Fig.3: Bis(μ -5-chloro-2-hydroxyacetophenone 4-nitrobenzohydrazone)-bis[dipyridinecadmium(II)]



3.3.2: Bis(μ -5-chloro-2-hydroxyacetophenone 4-nitrobenzohydrazone)-bis[dipyridinecadmium(II)]

In the title compound, the cadmium(II) complex is a centrosymmetric dimer with the ligand coordinated to the cadmium atom via O,N,O atoms in a distorted octahedral environment [11]. Two pyridine molecules occupy the axial position with N4-Cd1-N5 bond angle of 158.5 (1) $^{\circ}$. There are no classical intermolecular interactions found in the crystal structure.

3.3.3. Crystal data

The crystal data are shown in table 5.

3.4. Bioactivity

3.4.1 Cytotoxicity

The results of cytotoxicity testing are presented in Table 6. According to the United States National Cancer Institute, if the initial cytotoxicity test on cancer cell lines gives IC_{50} value less than 20 μgml^{-1} , this compound can be categorized as having a potential anticancer activity.

The Schiff base ligand, LNO₂Cl was more sensitive towards the MCF-7 cells (human breast cancer cells) with IC_{50} values of 4.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ than the unsubstituted ligand,

hydroxyacetophenone benzohyldrazone (HapBh). The nitro and chloro-substituents might have contributed to a mark increase in the cytotoxicity of the ligand. However on coordination to nickel, the activity has reduced the activity to the same level as the positive control drug, tamoxifen.

3.4.2 Antioxidant Property

The antioxidant property of the Schiff bases and the metal complexes are indicated in the table 7. The substituted ligand with the electron withdrawing groups (Cl and NO₂) had caused the molecule less reactive as antioxidant agent as compared to the unsubstituted ligand, HapBh). However the antioxidant activity of

Table 5: Crystallographic data for the Ni(II) and Cd(II) complexes

Parameter	Ni(II)	Cd(II)
Formulae molecule	[Ni ₂ (C ₁₅ H ₁₁ ClN ₃ O ₃) ₂ ·(C ₅ H ₅ N)]	[Cd ₂ (C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₄) ₂ ·(C ₅ H ₅ N) ₄]
Molecular weight	706.82	1204.62
Crystal system	Monoclinic, <i>P2 1/n</i>	Monoclinic, <i>C2/c</i>
Unit cell dimensions:		
a	12.585 (2) Å	19.115 (2) Å
b	21.175 (3) Å	12.012 (1) Å
c	12.704 (2) Å	22.071 (2) Å
α		90.00 °
β	90.211 (3) °	90.024 (1) °
Volume/Å ³	3385.7 (9)	5067.8 (8)
Z	4	4
Crystal colour & shape	Block, dark orange	Plate, orange
Crystal dimension/mm	0.42 x 0.23 x 0.14	0.29 x 0.26 x 0.07
Density (calculated) Mg m ⁻³	1.387	1.579
R(internal)	0.036	0.034
θ/°	1.8-27.5	1.9-27.5

Table 6: Cytotoxic activities of ligands and complexes.

Compounds	IC ₅₀ µg ml ⁻¹
HapBh	10.0
LNO ₂ Cl	4.5
[Zn(LNO ₂ Cl)]	Not available
[Ni(LNO ₂ Cl)(py) ₃]	18.2
[Cd(LNO ₂ Cl)(py) ₂] ₂	Not available
[Cu(LNO ₂ Cl)(DMSO)] ₂	Not available
Tamoxifen (+ve control)	18.2

Table 7: Absorbance values of ligands and complexes.

Compounds	Absorbance at 500 nm (Antioxidant activity)
HapBh	0.0214
LNO ₂ Cl	0.0698
[Zn(LNO ₂ Cl)]	Not available
[Ni(LNO ₂ Cl)(py) ₃]	1.847
[Cd(LNO ₂ Cl)(py) ₂] ₂	0.4989
[Cu(LNO ₂ Cl)(DMSO)] ₂	Not available
Vitamin E	0.6055
Quercetine	0.4546
BHT	0.0028

substituted ligand is stronger than quercetine and comparable to vitamin E.

Coordination of Ni(II) or Cd(II) to the ligand, LNO₂Cl has little influence on the antioxidant property of the complexes.

4. Conclusions

The new Ni(II) complex with ligand 4-Nitro-Benzoic acid[1-(5-chloro-2-hydroxy-phenyl)-ethylidene-hydrazide has yielded a monomer in pyridine while with Cd(II) is a centrosymmetric dimer. The phenolic hydroxyl O-atom bridges the two Cd(II) atoms to furnish the dinuclear complex.

The Schiff base ligand, LNO₂Cl was more sensitive towards the MCF-7 cells (human breast cancer cells) with IC₅₀ values of 4.5 µg ml⁻¹ than the unsubstituted ligand, HapBh. The nitro and chloro-substituents might have contributed to a mark increase in the cytotoxicity of the ligand. However on coordination to nickel, the activity has reduced the activity to the same level as the positive control drug, tamoxifen. However the electron withdrawing substituents, (Cl and NO₂) had caused the molecule less reactive as antioxidant agent as compared to the unsubstituted ligand, HapBh. The ligand is still stronger in antioxidant property than quercetine and comparable to vitamin E. Ni(II) or Cd(II) have little influence on the antioxidant property of the complexes.

5. References

- [1] Akbar Ali M, Mirza AH, Butcher RJ, Tarafder MT, Keat TB, Ali AM. *J Inorg Biochem.* 2002, Nov 25;92(3-4):141-8.
- [2] Hapipah M. Ali, Zuraini Kadir, M. Sukeri M. Yusof and Bohari M. Yamin, *Acta Cryst.* 2003, E59, m655-m657.
- [3] Hapipah M. Ali, Nur Ashikin Khamis, M.Shukeri Yusof and Bohari M. Yamin, *Acta Cryst.* 2004, m1191-m1192.
- [4] Hapipah M. Ali, Mazliza Mohammad, M. Sukeri M. Yusof and Bohari M. Yamin, *Acta Cryst.* 2004, E60, m123-m125.
- [5] Hapipah Mohd Ali, Nur Ashikin Khamis, Sharifudin M. Zain, Bohari Yamin, Endom Ismail, Faridah Abas, Nordin H. Lajis, Noorlidah Abdullah and H.L. Teoh and Norzalida Zakaria, 2004, UTM Conference.
- [6] A. Mukhopadhyay, G. Padmaja and S. Pal, *Inorg. Chem. Chom.* 2003, 6, 383-386.
- [7] Freshney, R.I. 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4th ed. John Wiley and Sons.
- [8] Wall, M.E., Taylor, H. & Wani, M. C. R. 1987. Plants antitumor agents, 24. Rapids 9-KB Assay. *J. Nat. Products*, 50 (4): 764-766.
- [9] H. Kikuzaki, N. Nakatani, *J. Food Sci.*, 1993, 1407.
- [10] Hapipah M. Ali, Nur Ashikin Khamis, W. Jefri Basirun and Bohari M. Yamin, *Acta Cryst.* 2004, E60, m912-m914.
- [11] Hapipah M. Ali, Nurul Fadhilah Kamalul Aripin and Seik Weng Ng, *Acta Cryst.* 2005, E61, m433-m434.

DAVIDIOL A, SUATU TRIMER resveratrol dari TUMBUHAN *Shorea RUGOSA*

Haryoto Saroyobudiyono¹, Euis H. Hakim², Yana M. Syah², Sjamsul A. Achmad²,
Lia D. Juliawaty², Ikram M Said³, Laily B. Din³, Jalifah Latip³

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta,

Jalan A.Yani Tomol Pos 1 - Pabelan Kartasura, Surakarta 57102, Indonesia.

²Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia,
Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10 Bandung 40132, Indonesia

³School of Chemical Science & Food Technology, Faculty of Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E., Malaysia.

Abstrak

Davidiol A, suatu trimer resveratrol telah diisolasi untuk pertama kalinya dari ekstrak aseton kulit batang tumbuhan Shorea rugosa. Struktur molekul dan konfigurasi relatif senyawa tersebut telah ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan perbandingan dengan data sejenis yang telah dilaporkan.

Kata Kunci : *Dipterocarpaceae, trimer resveratrol, davidiol A, Shorea rugosa.*

1. Pendahuluan

Dipterocarpaceae merupakan salah satu famili dari keanekaragaman hayati hutan Indonesia yang sangat berpotensi untuk dikembangkan, karena selain memiliki nilai ekonomi yang tinggi, kelompok tumbuhan ini juga menghasilkan berbagai jenis senyawa kimia golongan oligomer resveratrol. Senyawa oligomer resveratrol dalam tumbuhan ini meliputi dimer, trimer, tetramer, heksamer, heptamer, dan oktamer resveratrol (Sotheeswaran, 1993). Beberapa senyawa oligomer resveratrol yang berhasil diisolasi menunjukkan aktivitas biologi seperti anti fungi (Bokel, 1988), anti HIV (Dai, 1988), anti bakteri (Sotheeswaran, 1993; Nitta, 2003), anti inflamasi (Kitanaka, 1990), dan inhibitor 5 α reduktase (Hirano, 2000; Hakim, 2002).

Salah satu spesies meranti yaitu *Shorea rugosa* Heim, adalah endemik di Kalimantan, Sumatera, Semenanjung Malaysia dan Filipina (Ashton, 1983). Dalam makalah ini akan disampaikan penemuan davidiol A dari ekstrak aseton kulit batang tumbuhan ini. Struktur molekul senyawa hasil isolasi ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan perbandingan dengan data

sejenis yang telah dilaporkan sebagai data standar.

2. Percobaan

Umum. Titik leleh ditentukan dengan 'micro melting point apparatus'. Putaran optik diukur dengan polarimeter Perkin-Elmer 341 dalam MeOH. Spektrum UV dan IR ditetapkan dengan Cary Varian 100 Conc. dan Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometers. Spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR ditentukan dengan spektrofotometer JEOL ECP400, yang masing-masing beroperasi pada 400 MHz (¹H) dan 100, 5 MHz (¹³C). Kromatografi cair vakum menggunakan Si-gel 60 GF₂₅₄ (Merck), kromatografi kolom tekan menggunakan Si-gel 60 (230-400 mesh) (Merck), kromatografi radial menggunakan Si-gel 60 PF₂₅₄ (Merck), dan analisis KLT menggunakan plat KLT Kieselgel 60 F₂₅₄ 0,25 mm (Merck). Pelarut yang digunakan semuanya berkualitas teknis yang didestilasi.

Bahan Tumbuhan. Bahan tumbuhan berupa kulit batang *Shorea rugosa*, diperoleh dari Hutan Setinggal, Desa Sibubus, Kecamatan Paloh, Kabupaten Sambas, Provinsi Kalimantan Barat, pada bulan September 2004.

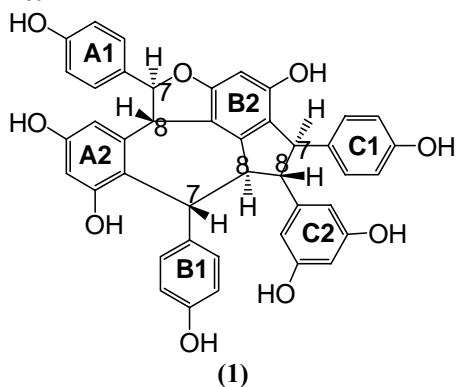
Tumbuhan tersebut diidentifikasi oleh staf Herbarium Bogoriense, Bogor.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kering kulit batang *S. rugosa* 4 kg diekstraksi dengan aseton. Ekstrak aseton selanjutnya dipekatkan pada tekanan rendah dan diperoleh gum berwarna coklat gelap (198 g). Ekstrak aseton tersebut, selanjutnya dilarutkan kembali dalam campuran MeOH-dietileter sehingga menghasilkan fraksi terlarut MeOH-dietileter, yang juga berupa gum berwarna coklat gelap (178 g). Fraksi MeOH-dietileter yang beratnya 81 gram kemudian difraksinasi dengan kromatografi vakum cair (KVC), (adsorben Sigel, eluen campuran heksan-etilasetat (6:4-etilasetat 100%, MeOH 100%)) menghasilkan 5 fraksi utama C₁-C₅ (masing-masing 15,3; 15,4; 15,2; 2,0 dan 3,7 g). Pemisahan fraksi C dengan kromatografi radial (Si-gel, kloroform:metanol = 9:1) menghasilkan davidiol A (25 mg).

Davidiol A, diperoleh berupa padatan berwarna coklat dengan t.l. 209-211 °C dan $[\alpha]_D^{20}$ -238 ° (c 0,1 MeOH). Spektrum UV (MeOH) λ_{maks} (log ϵ) 229 (5,08), dan 284 nm (4,42). Spektrum IR (KBr) ν_{maks} 3340 cm⁻¹ (gugus -OH), 1613, 1513, dan 1455 cm⁻¹ (C=C aromatik), dan 831 cm⁻¹ (*p*-disubstitusifenil). Spektrum ¹H NMR senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya enam proton -OH fenolik (δ_H 7,17; 6,97 (2H); 6,76; 6,57 (2H); dan 6,71; 6,58 (2H)). Spektrum ¹³C NMR senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya 18 C kuarternar (δ_C 127, 98 - 158, 90); 9 C-O oksiaril (δ_C 154, 84 - 159, 25); C - H alifatik (δ_C 36,46 - 85, 77) (Tabel 1).

3. Hasil dan Pembahasan

Struktur



Davidiol A (1) diperoleh berupa serbuk coklat memperlihatkan serapan maksimum pada λ_{maks} 229, dan 284 nm, yang mengalami pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser NaOH. Sementara itu spektrum IR senyawa ini menunjukkan adanya gugus hidroksil (ν_{maks} 3340 cm⁻¹), aromatik (1613, 1511, dan 1455 cm⁻¹) dan 1,4-disubstitusibenzena (831 cm⁻¹) yang merupakan ciri khas oligomer resveratrol yang telah memodifikasi kerangka oligomer resveratrol. Spektrum ¹H NMR (Tabel 1) memperlihatkan sejumlah sinyal aromatik yang sesuai dengan adanya tiga unit *p*-hidroksifenil (δ_H 7,17 ; 6,97; 6,76; 6,57; 6,71 dan 6,58 ppm), satu unit 3,5-dihidroksifenil (δ_H 6,42 dan 6,15), satu pasang proton koplिंग-*meta* dari unit 1,2,3,5-tetrasubstitusibenzen (δ_H 7,16 dan 6,07), dan satu proton aromatik untuk unit pentasubstitusibenzen (δ_H 6,01). Selain itu, spektrum ¹H NMR juga menunjukkan adanya enam sinyal proton alifatik, dua diantaranya khas untuk 2,3-disubstitusi-2,3-dihidrobenzofuran (δ_H 6,07 dan 4,40). Unit-unit struktur tersebut mempunyai derajat kesesuaian yang tinggi dengan struktur davidiol A.

Spektrum ¹³C NMR (APT) mendukung struktur davidiol A dari senyawa hasil isolasi, yang memperlihatkan 34 sinyal untuk 42 karbon. Sinyal-sinyal tersebut terdistribusi kedalam 9 karbon oksiaril, 8 karbon kuarternar aromatik, 18 karbon metin aromatik, dan 6 karbon metin alifatik, termasuk dua karbon dari cincin dihidrobenzofuran. Konformasi lebih lanjut terhadap struktur davidiol A diperoleh dari hasil perbandingan parameter NMR dengan yang dilaporkan untuk senyawa ini sebagaimana dinyatakan pada tabel 1. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah davidiol A, yang diisolasi dari *S. rugosa* untuk pertama kalinya.

Pembahasan lebih lanjut bahwa senyawa davidiol A telah ditemukan pada tumbuhan famili Leguminosae yaitu pada spesies *Sophora davidi* (Tanaka, 2000). Selain itu juga ditemukan pada tumbuhan famili Dipterocarpaceae terutama genus *Shorea*; yaitu *S. hemsleyana* (Ito, 2000), *S. guiso* (Muharini, 2002) dan *S. parvifolia* (Kholifatu Rosyidah, 2005). Khusus genus *Shorea*, senyawa davidiol A pada *S. rugosa* adalah penemuan yang keempat pada tumbuhan famili Dipterocarpaceae.

4. Kesimpulan

Pada penelitian terhadap kulit batang *Shorea rugosa* telah berhasil diisolasi suatu trimer resveratrol, yaitu davidiol A. Senyawa (1) merupakan penemuan yang ke empat pada famili Dipterocarpaceae khususnya genus *Shorea*.

5. Ucapan Terima kasih. Kami mengucapkan terima kasih kepada Depdiknas Dikti yang telah memberikan beasiswa BPPs, Pimpinan dan staf Universitas Muhammadiyah Surakarta, serta staf Herbarium Bogoriense, Bogor, yang telah mengidentifikasi tumbuhan untuk digunakan dalam penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

Ashton, P. S., 1983, *Flora Malesiana*, Series 1. Spermatophyta Vol.9, Martinus Nijhoff, London, 436 – 552.

Bokel, M., Diyasena, M.N.C., Gunatilaka, A.A.L., Kraus, W., Sotheeswaran, S., 1988, Caliculatol, an antifungal resveratrol trimer from *Stemonoporus canaliculatus*, *Phytochemistry*, **27**, 377 - 380.

Dai, J.R., Hallock, Y.F., Cardellina, J.H.H., and Boyd, M.R., 1988, HIV-Inhibitory and cytotoxicity oligostilbenes from leaves of *Hopea malibato*, *J.Nat.Prod.*, **61**,351-353.

Hirano, Y., Kondo, R., Sakai, K., 2001, Compounds inhibitory to rat liver 5 α - reductase from tropical commercial wood species: resveratrol trimers from melapi (*Shorea.sp*) heartwood, *Japan Wood Science*, **47**, 308 – 312.

Hakim, E. H., 2002, Oligostilbenoid dari tumbuh-tumbuhan Dipterocarpaceae, *Bull.Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, **I**, 1-19.

Ito, T.; Tanaka, T.; Ido, Y.; Nakaya, K.; Inuma, M.; Y.; Riswan, S., 2000, Stilbenoids isolated from stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1001-1005

Kitanaka, S., Ikezawa, T., Yasukawa, K., Yamanouchi, S., Takido, M., Sung, H –K., dan Kim, L-H., 1990, (+)- α -Viniferin, an antiinflammatory compound from *Caragana chamlaga* Root, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(2), 432-435.

Kholifatu Rosyidah, Syah,Y.M; Achmad, S.A; Hakim, E.H; Makmur, L; Juliawaty,L.D, 2005, (+)-(α)-Viniferin dan davidiol A, suatu trimer stilbenoid dari kulit batang *Shorea parvifolia* Dyer, Seminar Nasional Obat Tradisional Senyawa Alam, Unika Widya Mandala, Surabaya.

Muharini, R.; Hakim, E.H.; Achmad, S.A.; Aimi, N.; Makmur, L.; Syah, Y.M.; Juliawaty, L.D.; Kitajima, M.; Takayama, H., 2002, Davidiol A, a stilbenoid derivative from tree bark of *Shorea guiso* Blume, *Bull. Soc.Nat. Prod. (Indonesia)*, **2**, 37-40.

Sotheeswaran, S., and Pasupathy, V., 1993, Distribution of resveratrol oligomer in plants, *Phytochemistry*, **32**, 1083 – 1092.

Tanaka, T., Ito, T., Nakaya, K., Inuma, M., Riswan, S., 2000, Stilbene in roots of *Shorea davidii*, *Phytochemistry*, **53**, 1009 – 1014.

Tabel 1. Data ¹H NMR & ¹³C NMR senyawa 1 dan 1*

No. C	δ_H (multiplisitas, <i>J</i> dalam Hz)		δ_C	
	1	1*	1	1*
1a	-	-	134,9	134,4
2a,6a	7,17 (d, 8,4)	7,21 (d, 8,8)	128,0	128,1
3a,5a	6,76 (d, 8,8)	6,78 (d, 8,8)	116,0	116,6
4a	-	-	155,8	155,8
7a	6,07 (d, 3,3)	6,08 (d, 2,9)	85,8	85,8
8a	4,40 (d, 9,9)	4,40 (m)	50,3	50,4
9a	-	-	146,9	147,1
10a	-	-	117,8	118,1
11a	-	-	158,0	157,8
12a	6,38 (d, 2,2)	6,44 (brs)	101,3	101,3
13a	-	-	156,9	156,8
14a	6,53 (d, 2,2)	6,55 (brs)	103,7	104,0
16	-	-	137,3	137,5
2b,6b	6,97 (d, 8,4)	7,04 (d, 8,8)	129,5	129,6
3b,5b	6,57 (d, 8,8)	6,60 (d, 8,8)	115,3	115,4
4b	-	-	158,2	158,1
7b	5,24 (brs)	5,27 (brs)	36,5	36,5
8b	4,14 (d, 11,7)	4,23 (d, 11,7)	51,9	51,4
9b	-	-	143,1	143,1
10b	-	-	118,9	119,2
11b	-	-	159,2	159,4
12b	6,01 (s)	6,02 (s)	95,8	96,0
13b	-	-	154,8	154,7
14b	-	-	122,2	122,2
1c	-	-	134,2	134,1
2c,6c	6,71 (d, 8,8)	6,76 (d, 8,3)	129,7	129,9
3c,5c	6,58 (d, 8,8)	6,61 (d, 8,3)	115,4	115,6
4c	-	-	156,5	156,6
7c	4,36 (d, 8,0)	4,38 (d, 9,8)	55,9	56,2
8c	2,92 (dd, 11,7,8,0)	2,97 (dd, 11,7,9,8)	67,4	67,5
9c	-	-	143,9	143,9
10c	6,42 (d, 2,2)	6,42 (d, 2,9)	108,2	108,3
11c	-	-	158,9	158,9
12c	6,16 (t, 1,8)	6,19 (t, 2,9)	101,9	102,0
13c	-	-	158,9	158,9
14c	6,42 (d, 2,2)	6,42 (d, 2,9)	108,2	108,3

* Tanaka, T., dkk., 2000

1 = hasil isolasi ; 1* = davidiol A standar

Chemical and Biological Studies of Some Malaysian and Sumateran *Curcuma* Hasnah M. Sirat, Shajarahtunnur Jamil, Lee Lay Meng and Ngai Mun Hong

Department of Chemistry, Faculty of Science
Universiti Teknologi Malaysia
81310 Skudai, Johor, Malaysia

Abstract

Studies on some Curcuma plants of Malaysia and Sumatera have led us to the isolation of several interesting compounds chemically and biologically. Among them are several classes of sesquiterpenoids and diarylheptanoids. The orange rhizome Curcuma contain orange pigments, curcumin and its derivatives as the major constituents. Most of the rhizomes of Curcuma species investigated contain high yield of essential oils. They are mainly consist of sesquiterpenoids with the exception of C. mangga, a mango flavoured Curcuma contains high amounts of monoterpenoid, myrcene. Some of the rhizomes oil and isolated compounds have been found to be cytotoxic against brine shrimps, antioxidant, and antimicrobes. The chemistry of the major sesquiterpenoid constituent of C. xanthorrhiza has been transformed to several interesting bisabolane-type sesquiterpenoids.

Key word index: Curcuma, Zingiberaceae, sesquiterpenes, diarylheptanoids

1. Introduction

Curcuma species (Zingiberaceae) is widespread in east and southern Asia and has long been used as a gastrointestinal remedy and a spice [1]. Well-known example include the rhizomes of *C. longa* (syn. *C. domestica*) (*turmeric*), is an important in the folk medicine of South East Asia as antiseptic for wounds [2]. Dried and powdered rhizomes of *C. longa* have been reported to deter storage-pest, insects, such as *Tribolium castaneum* [3]. So far, many sesquiterpenoids have been isolated from *Curcuma spp* [4-9]. Recently the sesquiterpene, *xanthorrhizol* as well as other sesquiterpenes that are present in *rhizomes* of *C. xanthorrhiza* or *C. zedoaria* are insecticidal towards larvae of the vigorous pest insect, *Spodoptera littoralis*, when applied topically *via* larval integument [10].

The orange colour of the *Curcuma* rhizomes is always being associated with *curcumin* and its derivatives which are cytotoxic [11]. Two new curcuminoid pigments from *Curcuma domestica* have been reported [12]. Some of the curcuminoids from ginger are found to be a natural antioxidant [13-14]. In a continuation of

our study on the constituents of Zingiberaceae, we investigated the rhizomes of *Curcuma* species. We now wish to report the isolation and characterization of some constituents of Malaysian and Sumateran *Curcuma* and the chemistry of one of the sesquiterpenoid isolated as the main component of *C. xanthorrhiza*.

2. Result and Discussion

The chloroform extracts from dried and powdered rhizomes and the essential oils from the fresh rhizomes of *Curcuma* from Malaysia and Sumatera were purified using several chromatographic techniques and recrystallization to yield thirteen sesquiterpenes and two diarylheptanoids.

All of the compounds isolated were characterized by spectroscopic methods especially high field NMR 1D and 2D experiments. All of them have satisfactory spectroscopic data. Their structures were confirmed by comparison with their physical and spectral properties with those previously isolated from other species.

Curcuma ochrorhiza yielded four

sesquiterpenes, isofuranodiene (1), germacrone (2), furanogermenone (3) and zederone (4). *Curcuma ceruginosa* produced six sesquiterpenes, isofuranodiene (1), furanodienone (5), dehydrocurdione (6), curzerenone (7), 13-hydroxygermacrone (8), curcumenone (9) and zedoarol (10). *Curcuma xanthorrhiza* gave two sesquiterpenes ar-curcumene (11) and xanthorrhizol (12) and diarylheptanoid, curcumin (13), whereas *Curcuma domestica* gave sesquiterpene, ar-turmerone (14) together with curcumin (13). *Curcuma phaeocaulis* yielded two sesquiterpenes, isofuranodiene (1) and germacrone (2) and a diarylheptanoid 1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-phenyl-3-heptanone (15). *Curcuma heyneana* gave curcumanolides A (16) and B (17), isocurcumenol (18), curcumenol (19), and curcumenone (9). *Curcuma sp. A* contained biscurone (20), ar-curcumene (11), curzerone (21), and ar-turmerone (14), whereas *Curcuma sp. B* contained isofuranodiene (1), germacrone (2) and curzerenone (7).

Most of the essential oils tested were very toxic against brine shrimps especially *C. xanthorrhiza* (IC₅₀ 33.14) and *C. heyneana* (46.61). Xanthorrhizol was the compound responsible for the activity with IC₅₀ 25.91

Xanthorrhizol the major sesquiterpenoid from *C. xanthorrhiza* has been modified to several derivatives, including epoxide, acetyl and methoxyl. Xanthorrhizol has also been used as the starting material to prepare several natural sesquiterpenoids, curcuhydroquinone isolated from Gorgonian coral, *Pseudoterogorgia rigida* [18], 12,13-dihydro-12,14-dihydroxyxanthorrhizol [19], and helibisabonol A from *Helianthus annuus* [20].

3. Experimental

The NMR experiments were performed on either a Bruker AM 400 or Varian 300 FT-NMR spectrometers. MS were recorded on an HP GC-MS spectrometer. IR were recorded on a Perkin Elmer FT spectrophotometer.

Samples of *Curcuma*: *Curcuma domestica*, *C. xanthorrhiza* were purchased locally, *C. ochrorrhiza* and *C. aeruginosa* were provided by Mr. Ahmad A. Rahman (a botanist from UPM), and *C. phaeocaulis* was collected from Langkawi, Malaysia. *C. heyneana* and two more *Curcuma sp. A and B* (Kunyit A and B)

were obtained from Padang, Sumarea Only the rhizome parts were studied.

Isolation and Identification: The dried-powdered rhizomes were each extracted with chloroform in a Soxhlet apparatus for 20 hr. The fresh rhizomes were hydrodistilled in an all glass apparatus for 8 hr. The crude extracts were fractionated using vacuum column chromatography on silica gel with petroleum ether and ether gradient as eluents. The fractions were recombined based on TLC R_f values and were then subjected for further purification using column chromatography or preparative tlc several times. Pure compounds were then identified by spectroscopic techniques.

Isofuranodiene (1) - The crude extract of *C. ochrorrhiza* (15.0 g) was fractionated using VCC on silica gel with petroleum ether and ether gradient as eluents to give 15 fractions. Fraction 1 (2.50 g) was washed with MeOH and the solids was then washed with a mixture PE-Et₂O and recrystallized with Et₂O to give isofuranodiene (1) (0.20 g) as colourless crystals, m.p. 63.3 - 64.0 °C, lit. [15] 65 - 67 °C and lit. [16-17] 66 °C; ν_{\max} cm⁻¹: 2930, 1455, 1375; NMR ¹H: δ 1.28 (3H, s, H-15), 1.60 (3H, s, H-14), 1.92 (3H, s, H-13), 2.00 - 2.30 (5H, m, H-2, H-3 and H-4), 3.08 (2H, br.d, *J* 7.1 Hz, H-6), 3.50 (2H, AB quartet, *J* 16.0 Hz, H-9), 4.73 (1H, t, *J* 7.5 Hz, H-5), 4.94 (1H, dd, *J* 6.0 and 11.0 Hz, H-1), 7.06 (1H, s, H-12); MS: m/z 216 [M⁺] C₁₅H₂₀O.

Germacrone (2) - Fraction 3 (2.50 g) was purified by repeated CC using PE - Et₂O (9:1) as an eluent to give germacrone (2) (0.90 g) as colourless crystals; ν_{\max} cm⁻¹: 2917, 1672, 1439, 1383; NMR ¹H: δ 1.42 (3H, s, H-14), 1.64 (3H, s, H-15), 1.74 (3H, s, H-13), 1.78 (3H, s, H-12), 2.00-2.40 (4H, m, H-2 and H-3), 2.80-3.00 (3H, m, H-6 and H-9), 3.41 (1H, d, *J* 10.0 Hz, H-9), 4.70 (1H, dd, *J* 3.0 and 11.3 Hz, H-5), 5.00 (1H, br.d, *J* 10.0 Hz, H-1); RMN ¹³C: δ 207.82, 137.36, 134.99, 132.70, 129.38, 126.79, 126.48, 55.94, 38.16, 29.26, 24.17, 22.34, 19.90, 16.76, 15.62; MS: m/z 218 [M⁺] C₁₅H₂₂O.

Furanogermenone (3) - Fraction 3 (2.50 g) was also purified many times using CC on silica gel with PE-Et₂O (9:1) to give furanogermenone (3) (30 mg) as an unstable oil. ν_{\max} cm⁻¹: 1710, 1435, 1382; NMR ¹H: δ

1.11 (3H, d, J 7.0 Hz, H-14), 1.71 (3H, s, H-15), 1.90 (3H, s, H-13), 3.20 (2H, k AB, J 17.0 Hz, H-6), 3.50 (2H, AB quartet, J 17.0 Hz, H-9), 5.18 (1H, m, H-1), 7.10 (1H, s, H-12); MS: m/z 232 [M^+] $C_{15}H_{20}O_2$.

Zederone (4) - Fraction 4 (2.50 g) was purified using CC on silica gel PE-Et₂O (9:1) to provide 200 fractions. Fractions 49-63 were recombined, followed by evaporation of solvent to give semi solids sample (0.25 g) which was then washed with Et₂O, to give zederone (4) (60 mg) as colourless needles; m.p. 151.6 - 152.8 °C, lit. [4-9] 153.5 - 154.0 °C; ν_{max} cm^{-1} : 3420, 2933, 1662, 1426, 1371; NMR ¹H : δ 1.33 (3H, s, H-14), 1.60 (3H, s, H-15), 2.10 (3H, s, H-13), 2.30 (2H, m, H-3), 2.60 (2H, m, H-2), 3.70 (2H, AB quartet, J 16.5 Hz, H-9), 3.80 (1H, s, H-5), 5.48 (1H, dd, J 4.0 and 12.0 Hz, H-1), 7.10 (1H, s, H-12); RMN ¹³C : δ 192.22, 157.09, 138.09, 131.24, 131.08, 123.29, 122.27, 66.56, 63.96, 41.91, 38.03, 24.67, 15.74, 15.18, 10.27; MS : m/z 246 [M^+] $C_{15}H_{18}O_3$.

Isofuranodiene (1) - Crude extract of *C. aeruginosa* (19.0 g) was fractionated using VCC on silica gel with PE and Et₂O as an eluent to give 7 fractions. Fraction 2 (2.50 g) was purified with repeated CC to give isofuranodiene (1) (10 mg) as colourless oil; IR, MNR ¹H and MS were identical with data of previously isolated compound from *C. ochrorhiza*.

Furanodienone (5) - Fraction 3 (1.40 g) was purified using CC on silica gel with PE-Et₂O (9:1) as an eluent to furanodienone (5) (160 mg) as pale yellow oil; ν_{maks} cm^{-1} : 2930, 1648, 1426, 1375; NMR ¹H: δ 1.30 (3H, s, H-15), 1.99 (3H, s, H-14), 2.20 (3H, s, H-13), 2.20 - 2.60 (4H, m, H-2 and H-3), 3.69 (2H, s, H-9), 5.16 (1H, dd, J 4.8 and 11.1 Hz, H-1), 5.80 (1H, s, H-5), 7.08 (1H, s, H-12); NMR ¹³C : δ 190.01, 156.72, 145.99, 138.30, 135.62, 132.68, 130.76, 123.94, 122.41, 41.92, 40.89, 26.68, 19.21, 16.02, 9.80; MS : m/z 230 [M^+] $C_{15}H_{18}O_2$.

Dehydrocurdione (6) - Fraction 4 (3.00 g) was purified by CC on silica gel (150 g) with PE dan Et₂O (9:1) as an eluent to produce dehydrocurdione (6) (130 mg) as pale yellow oil; ν_{maks} cm^{-1} : 2921, 1709, 1688, 1454, 1373; NMR ¹H: δ 1.00 (3H, d, J 6.0 Hz, H-14), 1.65 (3H, s, H-15), 1.75 (1H, s, H-13), 1.78 (3H, s,

H-12), 2.00 - 2.20 (4H, m, H-2 and H-3), 2.40 (1H, m, H-4), 3.05 - 3.12 (4H, m, H-6 and H-9), 5.08 (1H, br. t, J 6.0 Hz, H-1); NMR ¹³C : δ 210.97, 207.12, 136.92, 132.92, 129.80, 129.24, 56.95, 46.54, 43.36, 34.12, 26.36, 22.05, 20.95, 18.35, 16.22; MS: m/z 234 [M^+] $C_{15}H_{22}O_2$.

Curcumenone (7) - Fraction 5 (0.80 g) was chromatographed on silica gel with PE-Et₂O (8:1) as an eluent to provide curcumenone (7) (40 mg) as pale yellow oil, ν_{maks} cm^{-1} : 2925, 1714, 1678, 1442, 1368; NMR ¹H: δ 0.44 (1H, dt, J 4.6 and 7.1 Hz, H-1), 0.66 (1H, q, J 4.6 Hz, H-5), 1.12 (3H, s, H-15), 1.60 (2H, q, J 7.1 Hz, H-2), 1.79 (3H, s, H-13), 2.08 (3H, s, H-12), 2.13 (3H, s, H-14), 2.46 (2H, t, J 7.1 Hz, H-3), 2.54 (2H, m, H-9), 2.80 (2H, br.s, H-6); NMR ¹³C: δ 208.20, 201.20, 146.00, 128.00, 48.90, 43.80, 29.90, 27.90, 24.00, 23.40, 23.20, 19.00; MS: m/z 234 [M^+] $C_{15}H_{22}O_2$.

13-hydroxygermacrone (8) - Fraction 7 (0.40 g) was purified using CC on silica gel (70.0 g) with a mixture of PE-EtOAc (10:1) as an eluent to give 13-hydroxygermacrone (8) (40 mg) as brownish oil; ν_{maks} cm^{-1} : 3424, 2924, 1677, 1438, 1386; ¹H NMR: δ 1.32 (3H, s, H-14), 1.40 (3H, s, OH), 1.62 (3H, s, H-15), 1.82 (3H, s, H-12), 2.00 - 2.40 (4H, m, H-2 and H-3), 2.96 (2H, m, H-6), 3.44 (2H, d, J 10.0 Hz, H-9), 4.22 (2H, AB quartet, J 12.0 Hz, H-13), 4.66 (1H, dd, J 6.0 and 9.0 Hz, H-5), 4.99 (1H, br.d, J 12.0 Hz, H-1); NMR ¹³C : δ 206.96, 139.54, 135.53, 132.84, 131.10, 126.06, 124.69, 62.53, 55.26, 37.81, 28.37, 23.82, 17.54, 16.38, 15.36; MS : m/z 234 [M^+] $C_{15}H_{22}O_2$.

Zedoarol (9) - Fraction 3 (0.40 g) was further purified by CC on silica gel (80.0 g) and was eluted with PE -: Et₂O (9:1) to give zedoarol (9) (60 mg) as pale yellow oil; ν_{maks} cm^{-1} : 3447, 2961, 1654; NMR ¹H : δ 1.20 (3H, d, H-14), 1.40-2.00 (7H, m, H-2, H-3 and H-13), 2.20 (s, OH), 2.50 (1H, m, H-4), 3.00 (1H, m, H-1), 3.70 (2H, AB quartet, H-9), 5.18 (1H, br.s, H-15), 5.30 (1H, br.s, H-15), 7.10 (1H, s, H-12); MS: m/z 246 [M^+] $C_{15}H_{18}O_3$.

Curzerenone (10) - The essential oil was chromatographed on silica gel to afford curzerenone (10) (230 mg); ν_{max} cm^{-1} : 2928, 1675, 1562; NMR ¹H (CDCl₃): δ 1.2(3H, s, Me), 1.8(3H, s, Me), 2.2(3H, s, Me), 2.8(2H, s,

CH₂), 2.9(1H, s, CH), 4.5-5.0(4H, m, 2x =CH₂), 5.4-5.9(1H, dd, *J* 11 and 6 Hz, olefinic H), 6.9 (1H, s, furan H); MS: *m/z* 230 [M⁺] C₁₅H₁₈O₂.

The other species were studied in the same manner and the compounds isolated were listed below: α -curcumene (**11**), xanthorrhizol (**12**) and curcumin (**13**) from *C. xanthorrhiza*; ar-turmerone (**14**) and curcumin (**13**) from *C. domestica*; isofuranodiene (**1**), germacrone (**2**) and 1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-phenyl-3-heptanone (**15**) from *C. phaeocalis*.

Ar-Curcumene (11) - ν_{\max} cm⁻¹: 2960, 2925, 1520; NMR ¹H (CDCl₃): δ 1.17 (3H, d, *J* 7Hz, Me) 1.5(3H, s, Me), 1.60(3H, s, Me), 1.67(3H, m, CH₂ & CH), 2.31 (3H, s, Me), 2.69(2H, m, CH₂), 5.14 (1H, t, *J* 7Hz, olefinic H), 7.07 (4H, S, aromatic H). *m/z* 202, C₁₅ H₂₂.

Xanthorrhizol (12) - ν_{\max} cm⁻¹: 3420, 2962, 1620, 1590; NMR ¹H (CDCl₃): δ 1.22(3H, d, *J* 7 Hz, Me), 1.52(3H, S, Me), 1.66(3H, S, Me), 1.84(3H, m, CH₂ and CH), 2.21(3H, s, Me), 2.58(2H, m, CH₂), 4.72(1H, br.s, OH), 5.08(1H, t, *J* 7Hz, olefinic H), 6.65(1H, s, aromatic H), 6.85(2H, A₂B₂, ArH), M⁺ 218, C₁₅H₂₂O.

Curcumin (13) - ν_{\max} cm⁻¹: 3425, 1630, 1601, 1511, NMR ¹H (DMSO-D₆): δ 3.86(6H, s, 2xOMe), 3.9-4.1 (2H, br. 2xOH) 6.03(1H, br.s, CH=COH), 6.61-7.62(10H, m, 6 aromatic and 4 styryl protons), 9.60(1H, br.s, OH).

Ar-turmerone (14) - ν_{\max} cm⁻¹: 2928, 1675, 1562; δ (CDCl₃): 1.24(3H, d, *J* 6Hz, Me), 1.84 (3H, d, *J* 1Hz, Me), 2.08 (3H, d, *J* 4Hz, Me), 2.28(3H, s, Me Ar), 2.68(1H, m, CH), 3.30(2H, m, CH₂CO), 6.05(1H, br.s, olefinic H), 7.10 (4H, s, aromatic H); *m/z* 216 C₁₅H₂₀O.

1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-phenyl-3-heptanone (15) - ν_{\max} cm⁻¹: 3400, 2920, 1720, 1600 and 1500; ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.0-2.9(12H, m, 6xCH₂), 3.6(3H, s, OMe), 5.2(1H, s, OH), and 6.3-7.1 (8H, m, aromatic H).

Curcumanolide A (16) and Curcumanolide B (17) - Fractions (64-82) were combined and the solvent was evaporated to give a mixture of curcumanolide A (16) and curcumanolide B (17) (76.6 mg, 10.21 %) as yellow oil with R_f 0.53 in PE:Et₂O (4:1). IR ν_{\max} cm⁻¹: 2959, 1744, 1666, 1449, 1376 dan 1269; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.84 (3H, d, *J* 6.8 Hz, H-14₍₁₀₆₎),

0.94 (3H, d, *J* 6.0 Hz, H-14₍₁₀₇₎), 1.55 (3H, s, H-15₍₁₀₇₎), 1.70 (3H, s, H-15₍₁₀₆₎), 1.81 (6H, s, H-13₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 2.21 (6H, t, *J* 2.0 Hz, H-12₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 2.43 (3H, s, H-6₍₁₀₆₎ dan H-6a₍₁₀₇₎), 1.5-2.35 (10H, m, H-2₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎, H-3₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎ ad H-4₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 2.8-2.90 (3H, m, H-1₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎ and H-6b₍₁₀₇₎), 4.73 (2H, s, H-9a₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 4.85 (1H, s, H-9b₍₁₀₇₎) and 4.92 (1H, s, H-9b₍₁₀₆₎); RMN ¹³C (CDCl₃): δ 13.0 (C-14₍₁₀₇₎), 13.1 (C-14₍₁₀₆₎), 19.8 (C-15₍₁₀₇₎), 19.9 (C-15₍₁₀₆₎), 21.9 (C-13₍₁₀₇₎), 23.1 (C-3₍₁₀₆₎), 23.9 (C-13₍₁₀₆₎), 24.4 (C-12₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 26.3 (C-2₍₁₀₆₎), 27.4 (C-6₍₁₀₇₎), 27.5 (C-6₍₁₀₆₎), 30.8 (C-3₍₁₀₇₎), 33.8 (C-2₍₁₀₇₎), 42.7 (C-4₍₁₀₆₎), 45.2 (C-4₍₁₀₇₎), 52.1 (C-1₍₁₀₆₎), 56.0 (C-1₍₁₀₇₎), 89.6 (C-5₍₁₀₆₎), 91.6 (C-5₍₁₀₇₎), 112.7 (C-9₍₁₀₆₎), 114.0 (C-9₍₁₀₇₎), 120.7 (C-7₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎), 143.7 (C-11₍₁₀₆₎), 145.3 (C-11₍₁₀₇₎), 149.3 (C-10₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎) and 169.8 (C-8₍₁₀₆₎, ₍₁₀₇₎); MS: *m/e* (%) 234 (33) [M⁺, C₁₅H₂₂O₂], 178 (50), 165 (80), 164 (100) and 152 (85).

Isocurcumenol (18) - Fractions (105-118) were combined and solvent was evaporated to give sticky oil which was then repeatedly washed with petroleum ether to give isocurcumenol (54.8 mg, 7.31 %) as colourless crystals, m.p. 145-147°C (lit. [21] 144-146°C) and R_f 0.63 (PE:Et₂O / 3:2). IR (CHCl₃) IR ν_{\max} cm⁻¹: 3405, 2928, 1644, 1453, 1373 and 1216; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.98 (3H, d, *J* 6.4 Hz, H-14), 1.54 (3H, s, H-13), 1.77 (3H, s, H-12), 1.6-2.00 (6H, m, H-2, H-3 and H-6), 2.19 (1H, t, *J* 14.0 Hz, H-4), 2.4-2.60 (2H, m, H-9), 2.65 (1H, d, *J* 14.0 Hz, H-1), 2.78 (1H, s, OH), 4.71 (1H, t, *J* 2.0 Hz, H-15a) and 4.75 (1H, t, *J* 2.0 Hz, H-15b); ¹³C NMR(CDCl₃): δ 12.4 (C-14), 18.9 (C-13), 22.5 (C-12), 28.3 (C-2), 30.8 (C-3), 36.2 (C-9), 38.9 (C-6), 41.6 (C-4), 52.8 (C-1), 87.1 (C-5), 104.0 (C-8), 112.2 (C-15), 126.9 (C-11), 133.9 (C-7) and 145.1 (C-10); MS: *m/e* (%) 234 (3) [M⁺, C₁₅H₂₂O₂], 191 (35), 121 (48), 105 (100), 67 (55) and 41 (87).

Curcumenol (19) - Combined fraction (127-159) was concentrated to give a mixture of crystals in sticky oil. This mixture was washed repeatedly with PE to give curcumenol (19) (45.6 mg, 6.08 %) as colourless needles, m.p. 113-115°C (lit. [21] 114-116°C) and R_f 0.55 in PE:Et₂O (3:2). IR (CHCl₃) IR ν_{\max} cm⁻¹: 3378, 2957, 2873 and 1653; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.98 (3H, d, *J* 6.4 Hz, H-14), 1.55 (3H, s, H-15), 1.61 (3H, s, H-13), 1.77 (3H, s, H-12), 1.8-2.00 (6H, m, H-2, H-3 and H-6), 2.07 (1H, d, *J* 15.6 Hz, H-1), 2.61 (1H, d, *J* 15.6 Hz, H-4), 3.05

(1H, s, OH) and 5.71 (1H, s, H-9); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 11.8 (C-14), 20.9 (C-15), 18.9 (C-13), 22.3 (C-12), 27.5 (C-2), 31.2 (C-3), 37.1 (C-6), 40.3 (C-4), 51.2 (C-1), 85.7 (C-5), 101.5 (C-8), 122.1 (C-11), 125.8 (C-9), 137.2 (C-10) and 139.0 (C-7); SJ: *j/c* (%) 234 (15) [M⁺, C₁₅H₂₂O₂], 189 (26), 147 (30), 133 (38), 105 (100) and 91 (38).

Bisacurone (20) - Fraction 4 from fractionation gave bisacurone (20) (9.1 mg, 0.13 %) as yellow liquid with R_f 0.25 in PE:Et₂O (1:4). IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 3414, 2930, 1682, 1614, 1447, 1377 and 1047; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.88 (3H, d, *J* 6.4 Hz, H-15), 1.27 (3H, s, H-14), 1.86 (3H, s, H-13), 2.11 (3H, s, H-12), 1.7-2.50 (6H, m, H-1, H-2, H-7 dan H-8), 3.76 (1H, dd, *J* 2.8 and 7.2 Hz, H-3), 5.62 (2H, s, H-5 and H-6) and 6.04 (1H, s, H-10).

Curzerene (21) - Fraction (23-24) were combined to give isofuranogermacrane (curzerene) (22.2 mg, 0.32 %) as pale yellow oil with R_f 0.87 in PE. IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 2922, 1643, 1450, 1377 and 889; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.04 (3H, s, H-15), 1.72 (3H, s, H-14), 1.90 (3H, s, H-13), 2.2-2.70 (5H, m, H-5, H-6 and H-9), 4.73 (1H, s, H-3a), 4.84 (1H, s, H-3b), 4.95 (1H, d, *J* 10.8 Hz, H-2a), 4.97 (1H, d, *J* 17.6 Hz, H-2b), 5.85 (1H, dd, *J* 10.8 and 17.6 Hz, H-1) and 7.03 (3H, s, H-12); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 8.1 (C-13), 19.5 (C-14), 24.1 (C-6), 24.4 (C-15), 36.1 (C-9), 40.1 (C-10), 49.9 (C-5), 110.9 (C-2), 112.7 (C-3), 116.5 (C-7), 119.3 (C-11), 137.1 (C-12), 147.1 (C-1), 147.2 (C-4) and 149.5 (C-8).

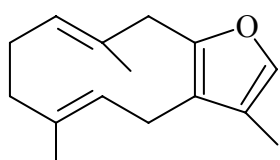
4. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Andrew Heaton of the Department of Chemistry, University of Western Sydney, Australia for hosting one of us (HMS) recording the NMR spectra, Dr. Hiroshi Morita of Tokyo College of Pharmacy, Japan Prof Norio Aimi and Dr. Mariko Kitajima of Chiba University, Japan for the help of high field NMR, Mr. Ayob Jabal of the Dept. of Chemistry, Universiti Teknologi Malaysia, for the help of mass spectra, Research and Development Unit for financial assistance and School of Graduate Studies for scholarship to one of us (SJ).

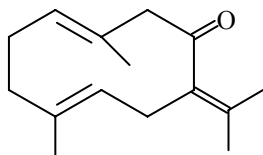
5. References

1. I. H. Burkill, A dictionary of the economic products of the Malay Peninsular, Ministry of Cooperatives and Agriculture, 1966, vol. 1.

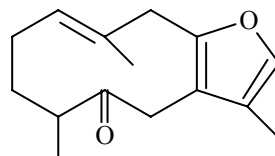
2. B. K. Euans, K.C. James and D.K. Luscombe, *J. Pharmacol. Sci.*, 1978, **67**, 277.
3. M. Grainage and S. Ahmad. Handbook of Plants with Pest-Control properties, John Wiley, N.York 1988.
4. H. Hikino, C. Konno & T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 1972, **20**, 987.
5. Y. Shiobara, Y. Asakawa, M. Kodoma and T. Takemoto, *Phytochemistry*, 1986, **25**, 1351.
6. H. Shibuya, Y. Yamamoto, I. Miura and I. Kitagawa, *Heterocycles*, 1982, **17**, 215.
7. J.F. Gao, T.ohkura, K. Halimays, M. Hikichi, T. Kawanata, W.X. Ying, Y. Itaka and S. Inayama, *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, **34**, 5122.
8. M. Kuroyanagi, A. Ueno, K. Ujiie and S. Sato, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, **35**, 53.
9. I. Kouno, and N. Kawano, *Phytochemistry*, 1984, **24**, 1845.
10. C. Pandji, C. Grimm, V. Wray, L. Witte and P. Proksch, *Phytochemistry*, 1993, **34**, 415.
11. H.W.D. Mathes, B. Luu and G. Ourisson, *Phytochemistry*, 1980, **19**, 2643.
12. R. Nakayama, J. Jamura, H. Yamanaka, H. Kikuzaki and N. Nakatani, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 501.
13. S. Toda, T. Miyase, H. Arichi and Y. Takino, *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, **33**, 1725.
14. H. Kikuzaki and N. Nakatani, *J. Food Sci.*, 1993, **58(6)**, 1407.
15. B. F. Bowden, J. Braekman, J. C. Coll, S. J. Mitchell, *Aust. J. Chem.*, 1980, **33**, 927.
16. G. Rucker, G. A. Assis Brasil E Silva, L. Baur, *Phytochemistry*, 1971, **10**, 221.
17. P. Weyersahl, H. M. Weyerstahl, C. Christiansen, B. O. Oguntimein and A. O. Adeoye, *Planta Med.*, 1988, **54**, 546.
18. F. J. Mcenroe, and W. Fenical, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 1661.
19. M. I. Aguilar, G. Delgado, M. L. Hernandez and m. L. Villarreal, *Nat. Prod. Lett.*, 2001, **15**, 93.
20. F. A. Macais, A. Torres, J. L. G. Galindo, R. M. Varela, J. A. Alvarez and J. M. G. Molinillo, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 687.
21. K. Firman, T. Knoshita, A. Itai and U. Sankawa, *Phytochemistry*, 1988, **27**, 3887.



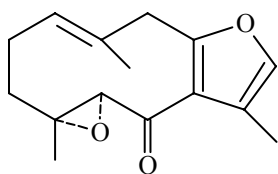
(1)



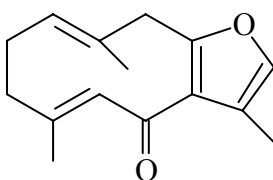
(2)



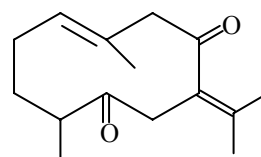
(3)



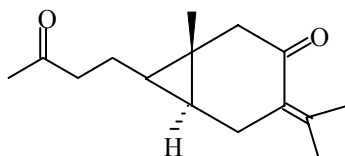
(4)



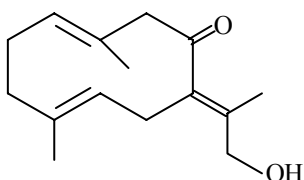
(5)



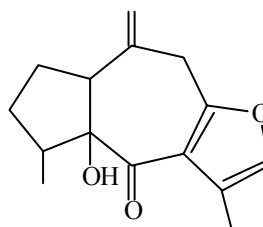
(6)



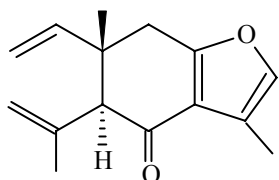
(7)



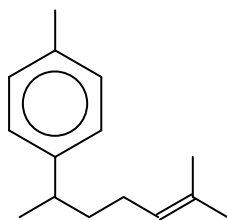
(8)



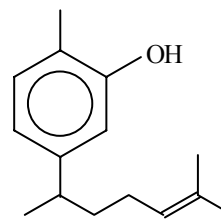
(9)



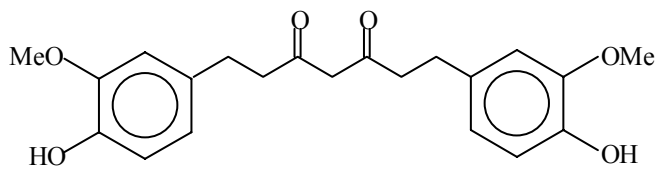
(10)



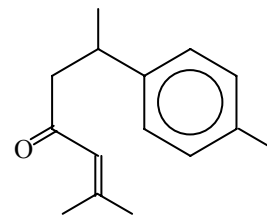
(11)



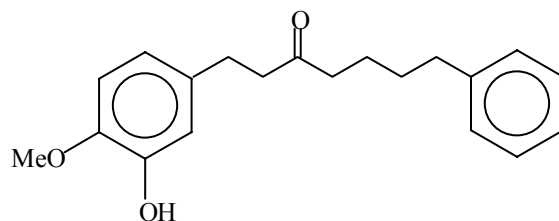
(12)



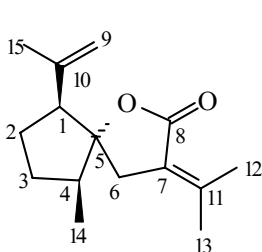
(13)



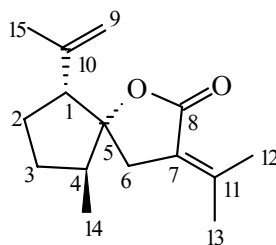
(14)



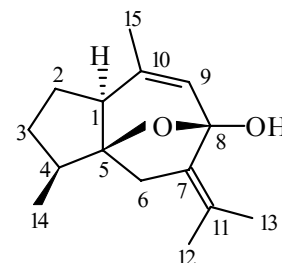
(15)



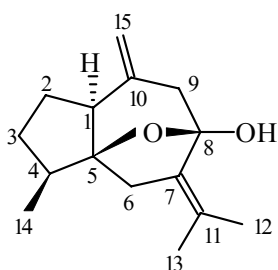
(16)



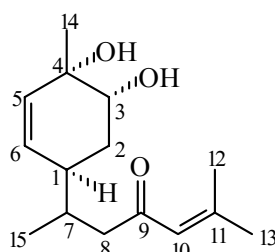
(17)



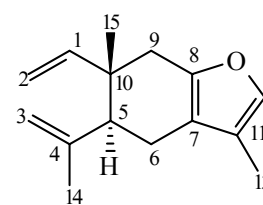
(18)



(19)



(20)



(21)

Penambahan Pati Pada Hasil Oksidasi LLDPE dengan Menggunakan Pipet Eppendorf

Hasnah Muin

Teknologi Tekstil Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri
Universitas Islam Indonesia, Jl. Kaliurang KM 14,5 Yogyakarta
Telp. 0274-895287, Fax: 0274-895007
E-mail: Hasnah Muin 2002 @ yahooo.com

Abstrak

Linear Low Density Polyethylene (LLDPE) merupakan salah satu jenis plastik yang banyak digunakan sebagai bahan pengemas. Senyawa ini bersifat inert dan sangat sulit untuk diuraikan oleh mikroba tanah. Saat ini, sampah LLDPE merupakan salah satu masalah lingkungan yang cukup serius. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa oksidasi LLDPE dengan $KMnO_4$ dalam suasana netral dapat menghasilkan gugus fungsi yang dapat terhidrolisa dan teroksidasi lanjut, sebagai langkah awal pembuatan plastik yang dapat terbiodegradasi. Untuk mempercepat proses biodegradasi, pada penelitian ini telah dilakukan reaksi antara hasil oksidasi LLDPE dengan $KMnO_4$ dalam suasana netral dengan pati yang telah ditambah aditif. Analisa FTIR dan UV menunjukkan terjadi reaksi antara hasil oksidasi dengan pati. Dibandingkan dengan hasil oksidasi LLDPE, film dari campuran hasil oksidasi dengan pati mempunyai derajat kristalinitas yang lebih rendah, dan analisa SEM menunjukkan tidak ada kerusakan pada permukaan LLDPE. Diharapkan penelitian ini merupakan salah satu cara untuk memodifikasi polimer sintetik guna membentuk materi polimer yang kemungkinan dapat terbiodegradasi.

Kata Kunci: LLDPE, OKSIDASI, $KMnO_4$, Pati

1. Pendahuluan

Linear Low Density Polyethylene (LLDPE) merupakan suatu jenis plastik yang banyak dipakai dalam kehidupan sehari-hari. Senyawa ini bersifat inert dan sukar terbiodegradasi^{1,2)}. Usaha yang telah dilakukan selama ini, dengan cara *blending* LLDPE dengan pati belum dapat menyelesaikan masalah karena yang dimakan mikroba hanyalah pati dan bagian ujung dari polimer tersebut.³⁾ Sifat biodegradasi suatu polimer sangat dipengaruhi oleh struktur molekulnya. Suatu polimer sintetik yang pada rantai utamanya mengandung gugus fungsi yang dapat teroksidasi dan terhidrolisa pada umumnya mudah terbiodegradasi.⁴⁾ Dapat dikatakan sebagai langkah awal terjadinya proses biodegradasi adalah adanya gugus fungsi yang dapat teroksidasi dan terhidrolisa. Pada penelitian terdahulu telah dilakukan pemasukan gugus fungsi yang dapat teroksidasi dan terhidrolisa pada rantai LLDPE dengan cara oksidasi menggunakan $KMnO_4$ dalam

suasana netral⁵⁾. Pati merupakan senyawa yang dapat mengundang masuknya mikroba. Oleh sebab itu untuk mempercepat terjadinya proses biodegradasi pada penelitian ini telah dilakukan reaksi antara pati dengan hasil oksidasi LLDPE dengan $KMnO_4$. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan bahan plastik yang dapat terbiodegradasi, sehingga pencemaran lingkungan akibat sampah plastik dapat diatasi.

2. Experimental

2.1 Bahan dan alat

Bahan LLDPE yang telah dioksidasi diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya.

Proses reaksi dilakukan dalam labu leher tiga, yang dilengkapi dengan pendingin balik, corong pemisah dan pengaduk magnetik. Analisis gugus fungsi dengan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) merk Perkin Elmer, derajat kristalinitas dengan Difraksi Sinar X (Difraktometer DX-Gerd-12 merk Jeol) analisis sifat permukaan menggunakan foto

SEM (*Scanning Electron Microscopy*).

2.2 Metoda

2.2.1 Cara Mereaksikan Hasil Oksidasi

LLDPE dengan Pati

Ke dalam labu leher tiga kapasitas 250 ml, yang dilengkapi corong pisah, pendingin balik dan pengaduk magnetik, dimasukkan 10 g LLDPE yang telah dioksidasi dan kemudian dilarutkan dalam 100 ml pelarut xilen pada temperatur 110°C. Setelah larut temperatur didinginkan sampai 50-60°C, ditambah larutan pati yang mengandung aditif dan proses reaksi dijalankan selama 2 jam sampai tercampur sempurna. Hasil reaksi yang berbentuk gel diangin-anginkan di lemari asam, dicuci dengan air dan dikeringkan dalam oven vakum. Pada air pencucian dilakukan tes KI untuk mengetahui apakah pati sudah beraksi sempurna dengan LLDPE atau belum. Tes KI menunjukkan hasil yang negatif. Zat yang telah kering dibuat film dan dikarakterisasi dengan menggunakan FTIR, UV, XRD dan foto SEM

2.2.2 Karakterisasi Hasil Oksidasi

2.2.2.1 Analisa gugus fungsi

Analisa gugus fungsi dilakukan terhadap sample yang telah dibuat film dengan menggunakan FTIR merk Perkin Elmer.

2.2.2.2 Penentuan Derajat Kristalinitas

Penentuan derajat kristalinitas dilakukan dengan menggunakan Difraksi Sinar X (Difraktometer DX-Gerd -12 merk Jeol) dengan Kecepatan goniometer = 4° / menit kecepatan kertas spektrograf 20 mm/menit serta jangkauan sudut pengukur (2θ) antara 6-36°

2.2.2.3 Uji Sifat Permukaan

Untuk melihat sifat permukaan terutama keretakan pada permukaan akibat oksidasi, digunakan teknik *scanning electron microscopy* (SEM). Bahan yang digunakan adalah lempeng LLDPE dan emas sebagai konduktor bahan pelapis.

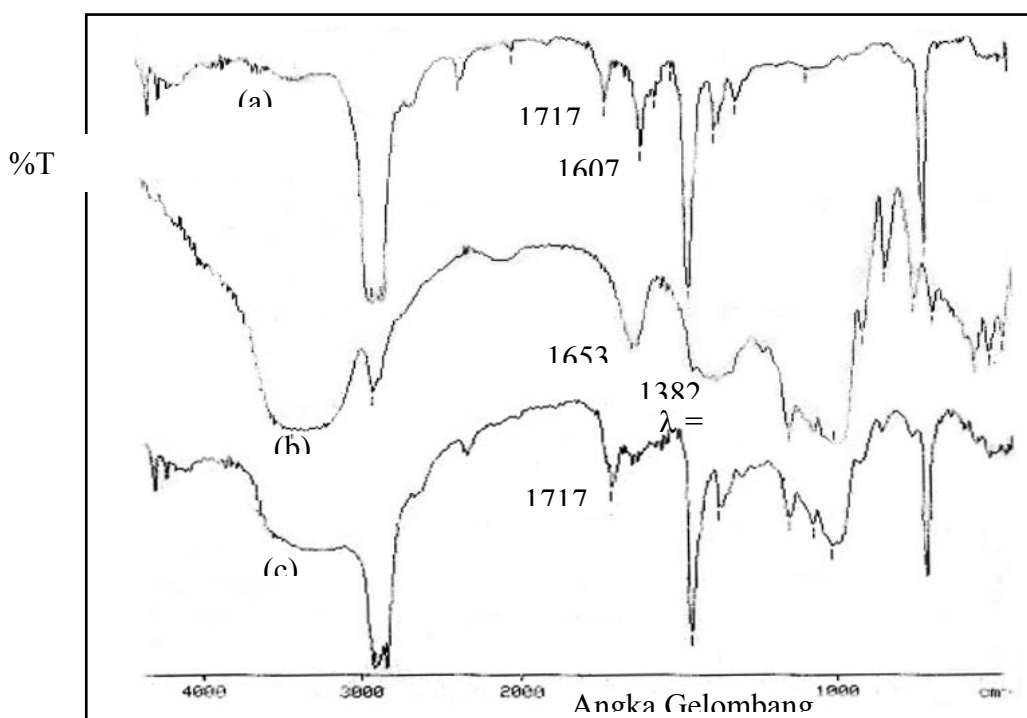
3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini diteliti perubahan struktur kimia yang terjadi pada campuran LLDPE yang telah dioksidasi dengan pati menggunakan FTIR dan UV. Derajat kristalinitas dan sifat permukaan ditentukan dengan XRD dan SEM.

3.1 Analisa Gugus Fungsi Hasil Oksidasi LLDPE Sebelum Dan Sesudah Pati Dengan FTIR

Analisa FTIR hasil oksidasi sebelum dan sesudah ditambah pati terlihat pada Gambar 1.

Analisa gugus fungsi hasil oksidasi, pati dan



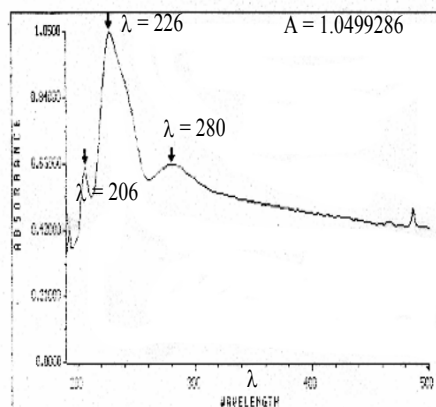
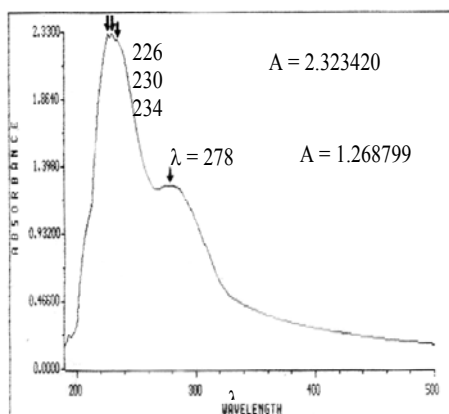
Gambar 1. Spektra FTIR: (a) Hasil Oksidasi LLDPE + KMNO₄, (b) Pati, (c) Campuran hasil oksidasi dengan pati.

Tabel 1 Analisa Gugus Fungsi Hasil Oksidasi, Pati dan Hasil Oksidasi Tambah Pati

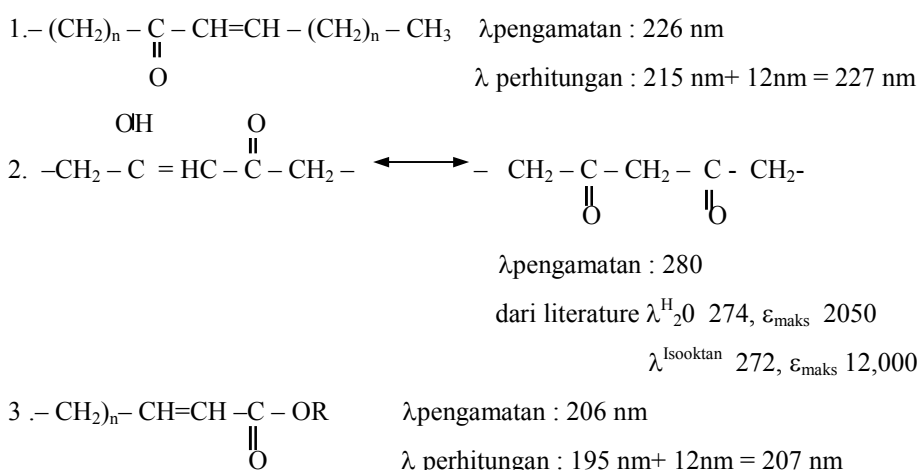
Sample	Angka Gelombang (cm) ⁻¹	Tafsiran Gugus Fungsi
a	1717,9	-C=O
	1607,8	-C=O dalam bentuk enol C=C-
	1559,6	OH
	3500	
b	1653,8	-OH pati + air
	1382	-C-O-C-dari pati
	1155	-C-O-C- dari pati
c	1717,5	-C=O
	1155	-C-O-C- dari pati

Tab2 Perubahan Indeks Karbonil Akibat Pencampuran Hasil Oksidasi dengan Pati

Sample	Angka gelombang (cm) ⁻¹	A	IC
a	1717,9	0,0945	0,0705
	1462,3	1,3979	
b	1717,5	0,1445	0.2042
	1462,3	0,7076	



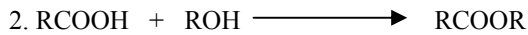
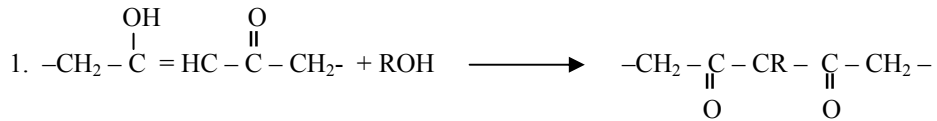
Gambar 2. Spektra UV: (a) Hasil Oksidasi LLDPE + KMNO₄ (b) Campuran hasil oksidasi dengan pati.



Skema 1. Puncak-puncak yang terdapat pada spektra b berdasarkan peraturan Woodward

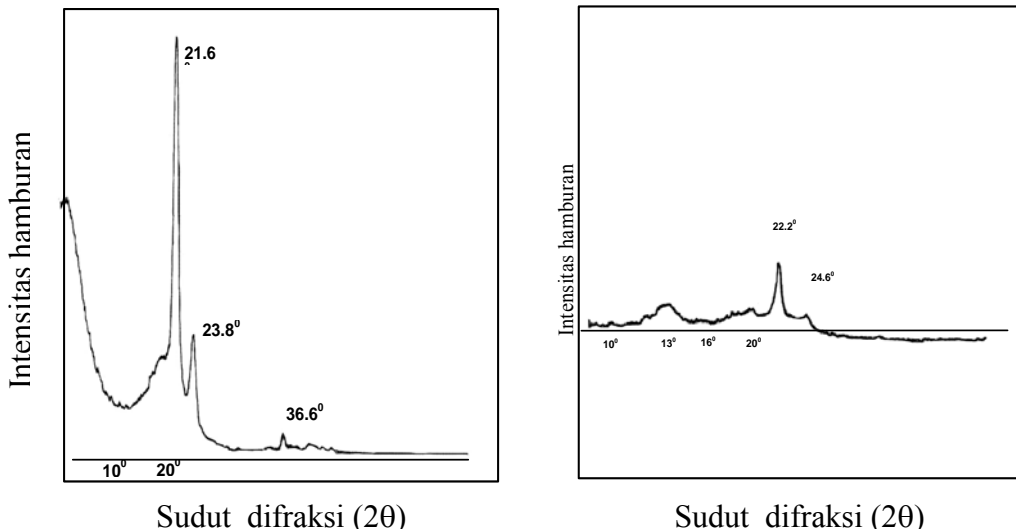
hasil oksidasi tambah pati terlihat pada tabel 1. Adanya puncak yang hilang dari spektra a dan b (tidak terlihat pada spektra c) menunjukkan

terjadi reaksi antara pati dan hasil oksidasi. Hal ini ditunjang dengan naiknya indeks karbonil pada 1717 cm⁻¹ seperti terlihat pada tabel 2.



Catatan : ROH adalah pati

Skema 2. Perkiraan reaksi berdasarkan analisa gugus fungsi



Gambar 3. Difraktogram X-ray (a) Hasil Oksidasi LLDPE dengan KMnO_4 , (b) Hasil Oksidasi LLDPE + Pati

Tabel 3 Perubahan derajat kristalinitas akibat penambahan pati

Sample	Derajat Kristalinitas
Hasil Oksidasi	50,3
Hasil Oksidasi + Pati	29,1

Analisa spektra UV terlihat pada gambar 3.

Berdasarkan peraturan Woodward puncak-puncak yang terdapat pada spektra b ditunjukkan pada skema 1.

Berdasarkan analisa gugus fungsi di atas diperkirakan reaksi yang terjadi ditunjukkan pada skema 2.

3.2 Penentuan derajat kistalinitas terlihat pada gambar 2 di bawah ini:

Perubahan derajat kristalinitas akibat penambahan pati terlihat pada tabel 3.

Terjadinya penurunan derajat kristalinitas menyebabkan proses biodegradasi akan lebih dipermudah.

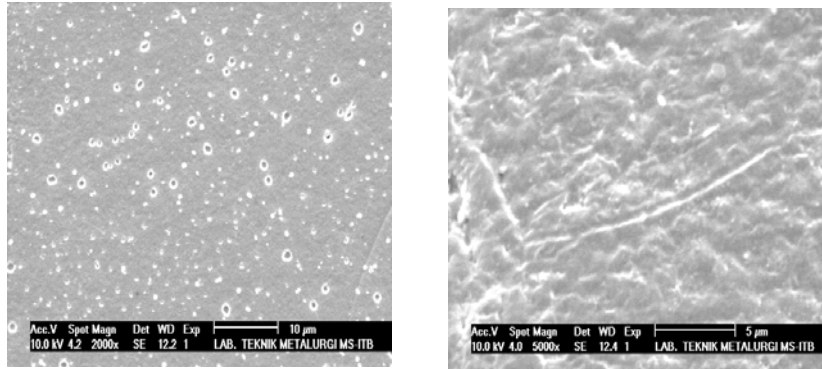
3.3 Analisa Permukaan dengan Menggunakan Foto SEM

Analisa permukaan sebelum dan sesudah di tambah pati terlihat pada gambar 3.

Pada hasil oksidasi sebelum ditambah pati terlihat adanya lobang-lobang karena terjadi gugus karboksilat yang menyebabkan terjadinya pemutusan rantai. Setelah ditambah pati tidak terlihat adanya lobang-lobang yang diduga karena terjadinya reaksi antara gugus karboksilat dengan gugus OH yang berasal dari pati.

4. Kesimpulan

Dari penelitian di atas dapat disimpulkan, bahwa dengan penambahan pati dapat menurunkan derajat kristalinitas, dan menutupi



Gambar 4. Foto SEM (a) Hasil Oksidasi LLDPE + KMnO_4 , (b) Pati, (c) Campuran hasil oksidasi dengan pati.

lobang-lobang yang terdapat pada permukaan LLDPE akibat oksidasi. Diharapkan plastik yang dihasilkan merupakan plastik yang ramah lingkungan, dengan permukaan yang tidak mengalami kerusakan

5. Daftar Pustaka

1. Billmeyer, F.W.JR (1984), *Textbook of Polymer Science*, 3rd Ed, Wiley, Interscience, N.Y 379- 385
2. Odion, G. (1991), *Principles of Polymerization*, John Wiley& Son, INC. 3rd Ed, 303-306, 605, 607.
3. Kaplan, D.L, J.M.Mayer, D.Ball, J.McCassie, A.L.Allen and P.Stenhouse (1993), *Fundamental of Biodegradable Polymers dalam Biodegradable Polymer and Packaging*, Technomic Publishing Company, Inc, 1-41
4. Huang, S.J. (1989), Biodegradation, dalam *Comprehensive Polymer Science*, New York : Pergamon Press, 597-606
5. Muin.H (2005), Memasukkan Gugus Fungsi Pada Rantai LLDPE (*linear Low Density Polyethylene*) Untuk Mempermudah Degradasi, Disertasi, ITB 2005



Elektrode Kawat Terlapis Perak/Perak Iodat Sebagai Elektrode Selektif Ion Iodat

Hendyk Krisna Dani, Ani Mulyasuryani, Wiwit Nurhayati, Sri Hidayati

Jurusan Kimia, Universitas Brawijaya, Jalan Veteran, Malang, Indonesia

Abstract

Ion iodat dalam suatu sampel dapat dianalisis dengan menggunakan elektrode perak/perak iodat ($Ag/AgIO_3$) yang dipersiapkan dengan metode kawat terlapis. Pembuatan elektroda $Ag/AgIO_3$ dilakukan dengan mengelektrolisis kawat perak di anoda dalam larutan kalium ioda jenuh, pada potensial tetap (0,75 - 0,85 Volt). Pada penelitian ini dipelajari pengaruh lama elektrolisis dan konsentrasi larutan NaCl terhadap harga bilangan Nernst, sebagai elektroda pembanding digunakan $Ag/AgCl$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa harga bilangan Nernst meningkat dengan bertambahnya lama elektrolisis, namun pada waktu elektrolisis di atas 30 menit harga bilangan Nernst menurun kembali. Lama elektrolisis optimum adalah 30 dengan harga bilangan Nernst sebesar 51,6 mV/dekade, pada kisaran konsentrasi iodat sebesar 10^{-3} M hingga 0,4 M. Adanya NaCl dalam larutan analit dapat menurunkan bilangan Nernst yang sangat signifikan.

Paper is not available

Pengembangan Metode Baru Untuk Penentuan Tiosianat Secara Kontinyu

Hermin Sulistyarti¹⁾, E. Sulisty²⁾, A. Wiryawan¹⁾, D. I. Lestari¹⁾, D. Umaningrum¹⁾

1) Jurusan Kimia, Universitas Brawijaya

Jl. Veteran No. 1, Malang, Indonesia

e-mail: hermin@brawijaya.ac.id

2) Jurusan Teknik Mesin, Universitas Brawijaya

Jl. Veteran No. 1, Malang, Indonesia

Abstrak

Teknik injeksi alir (Flow Injection Analysis, FIA) yang merupakan dasar metode analisis otomatis telah berhasil dikembangkan dan dimodifikasi untuk penentuan tiosianat secara kontinyu. Dalam metode ini, sistem FIA dimodifikasi menjadi sistem alir kontinyu dan digabungkan dengan sell difusi gas (Gas Diffusion Cell) sehingga sampel tidak diinjeksikan tetapi dialirkan secara kontinyu ke dalam sistem. Proses pemipetan, pengocokan dan pengukuran dilakukan dalam satu tahap dalam sistem alir melalui pipa kapiler yang didorong oleh sistem pompa tiga channel. Dengan demikian, waktu analisis, jumlah reagen, dan jumlah sampel bisa ditekan sampai antara 50-100 kali lebih efisien. Sampel tiosianat (channel-1) dialirkan dan direaksikan dengan reagen pengoksidasi, Cerium(IV) dalam asam sulfat, (channel-2) membentuk asam sianida dalam aliran donor sell difusi gas. Asam sianida ini akan berdifusi melalui membran semipermeabel menuju aliran akseptor yang berisi reagen Nikel(II) beramoniak (channel-3) membentuk kompleks tetrasianonikelat(II) yang dapat dideteksi secara spektrofotometri pada panjang gelombang 267 nm. Metode ini telah dioptimasi terhadap parameter operasioanal, seperti panjang koil, kecepatan alir, serta parameter kimiawi, meliputi konsentrasi Cerium(IV), asam sulfat, dan Nikel(II). Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan mempunyai linieritas terhadap tiosianat sampai 100 ppm dengan limit deteksi 0,3 ppm. Metode ini juga telah diaplikasikan pada sampel alami, yaitu sampel urine perokok aktif, limbah fotografi, dan limbah industri emas dan dibandingkan dengan metode standar dengan hasil yang memuaskan.

Paper is not available

Biodiversitas Mikroorganisme Termofilik Isolat Kawah Hujan, Kamojang, Jawa Barat

H. Yohandini¹⁾, F. Madayanti¹⁾, P. Aditiawati²⁾, dan Akhmaloka¹⁾

1)Departemen Kimia, 2) Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha No 10, Bandung, 40132 Indonesia

Abstrak

Sumber-sumber air panas dengan kondisi fisik dan kimia berbeda yang banyak ditemukan di Indonesia memiliki potensi besar bagi keanekaragaman mikroba termofilik yang tinggi. Pada penelitian ini, telah dilakukan upaya analisis keanekaragaman mikroba termofilik melalui pendekatan tradisional dan molekuler dari kawah-kawah di sekitar Kawah Hujan 1, Kawah Hujan 2, Kawah Hujan 3, dan Kawah Hujan 4. Sampel dari Kawah Hujan 1 berhasil ditumbuhkan dalam media sintetik ½ LB, media *Sulfolobus*, dan media pereduksi-sulfat. Dari Kawah Hujan 2 diperoleh kultur dalam media sintetik Termus, ½ LB, NB, dan media *Spirocetes*, sedangkan dari Kawah Hujan 4 diperoleh kultur dalam media sintetik ½ LB. Untuk keperluan analisis secara molekuler telah diperoleh hasil amplifikasi gen 16S rRNA dengan cara touchdown PCR, berukuran sekitar 390 pb, yang mengandung daerah variabel V9 dari mikroba yang dikulturkan. Hasil amplifikasi selanjutnya akan digunakan untuk analisis DGGE.

1. Pendahuluan

Penelitian terhadap mikroba termofilik memberikan banyak keuntungan baik untuk pengembangan ilmu dasar maupun kemungkinan penggunaannya pada bidang industri (Vielle, *et.al.*, 2001; Raysenbach, *et.al.*, 2002). Pada umumnya, mikroba termofilik dapat menghasilkan enzim-enzim (termozim) tahan panas dan mempunyai aktifitas optimum pada temperatur tinggi. Dalam bidang industri, penggunaan termozim sebagai biokatalis pada reaksi yang memerlukan suhu tinggi sangat potensial karena bisa menurunkan biaya produksi, mempertinggi produktifitas, dan menghindari kontaminasi (Vielle, *et.al.*, 2001).

Indonesia yang merupakan salah satu wilayah vulkanik terbesar di dunia memiliki lebih dari 120 gunung berapi (Kusumadinata, 1979). Sumber air panas yang banyak ditemukan di sekitar gunung berapi merupakan habitat potensial bagi mikroba termofilik. Sampai saat ini, masih sedikit komunitas mikroba termofilik yang berasal dari sumber air panas Indonesia yang telah dikarakterisasi.

Analisis keanekaragaman mikroba pada suatu komunitas dapat dilakukan melalui beberapa pendekatan. Para peneliti sepakat bahwa cara tradisional memiliki keterbatasan dalam pengenalan keanekaragaman mikroba suatu komunitas pada habitat alaminya. Ukuran mikroba yang sangat kecil dan penampakan mikroba yang mirip menyulitkan pembedaan spesies secara mikroskopis. Selain itu, kurangnya variasi morfologi pada mikroba menyebabkan kebergantungan terhadap kultivasi untuk identifikasinya. Walaupun demikian, pembuatan kultur murni diperlukan dalam karakterisasi mikroba seperti pemahaman fisiologi dan genetika mikroba (Ward, *et.al.*, 1998).

Pengamatan populasi individu dalam komunitas mikroba lebih dimungkinkan melalui pendekatan molekuler. Penggunaan urutan ribosomal RNA atau ATPase (atau gen pengkodennya) merupakan salah satu cara untuk mengenali keberadaan spesies mikroba dalam suatu komunitas tanpa keperluan kultivasi. Beberapa teknik *fingerprinting* yang berbasis PCR telah dikembangkan untuk keperluan

analisis komunitas mikroba pada habitat alaminya, seperti DGGE/TGGE (*denaturing/temperature gradient gel electrophoresis*), SSCP (*single-stranded conformation polymorphism*), dan T-RFLP (*terminal-restriction fragment length polymorphism*). Pada umumnya, melalui teknik-teknik ini, pemisahan secara fisik terhadap keseluruhan produk gen komunitas yang diamplifikasi memungkinkan untuk dilakukan (Egert, *et.al.*, 2003). Pada penelitian ini telah dilakukan upaya analisis keanekaragaman mikroba pada sumber air panas Kawah Hujan dengan menggunakan teknik PCR berbasis gen 16S rRNA dan akan dilanjutkan dengan analisis DGGE, serta upaya pembuatan kultur mikroba yang terdapat pada sumber air panas tersebut.

2. Percobaan

Pengambilan sampel.

Sampel diambil dari empat tempat di sekitar Kawah Hujan, Kamojang Jawa Barat, yang selanjutnya disebut sebagai Kawah Hujan 1 (90°C, pH 2.6), Kawah Hujan 2 (>80°C, pH 7,2), Kawah Hujan 3 (90°C, pH 1,8), dan Kawah Hujan 4 (88°C, pH 3,5). Pengambilan sampel untuk analisis langsung dan kultivasi dilakukan dalam waktu yang bersamaan. Untuk keperluan analisis langsung, sekitar 5 liter air kawah dimasukkan ke dalam wadah yang ditempatkan dalam cooler berisi es yang digunakan untuk mendinginkan sampel selama dalam perjalanan. Setelah sampai di laboratorium, sampel disentrifugasi, untuk memisahkan lumpur, dan kemudian difiltrasi dengan menggunakan filter berukuran 0,22 mikron.

Untuk keperluan kultivasi, 50 ml sampel air kawah dimasukkan dengan siring ke dalam 50 ml media sintetik dua kali pekat yang telah disterilkan. Temperatur dijaga tetap panas selama dalam perjalanan dan setelah sampai di laboratorium sampel dalam media sintetik diinkubasi pada temperatur 60° atau 70° C.

Ekstraksi DNA

Masing-masing sampel yang telah dipeletkan dihomogenkan dalam bufer Tris-Cl 10 mM pH 8 yang mengandung Lisozim 0,8 mg/ml, diinkubasi pada temperatur 37°C selama 1 jam. Bufer lisis (2% SDS, 200 mM EDTA, proteinase K 0,8 mg/ml) dengan volum yang sama ditambahkan dan kemudian diinkubasi

pada temperatur 50-55°C selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan larutan III (K-asetat 3M, asam asetat 5M) dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan maksimum. Filtrat dipindahkan ke dalam tabung yang baru, kemudian dilakukan presipitasi etanol (Sambrook, 2001).

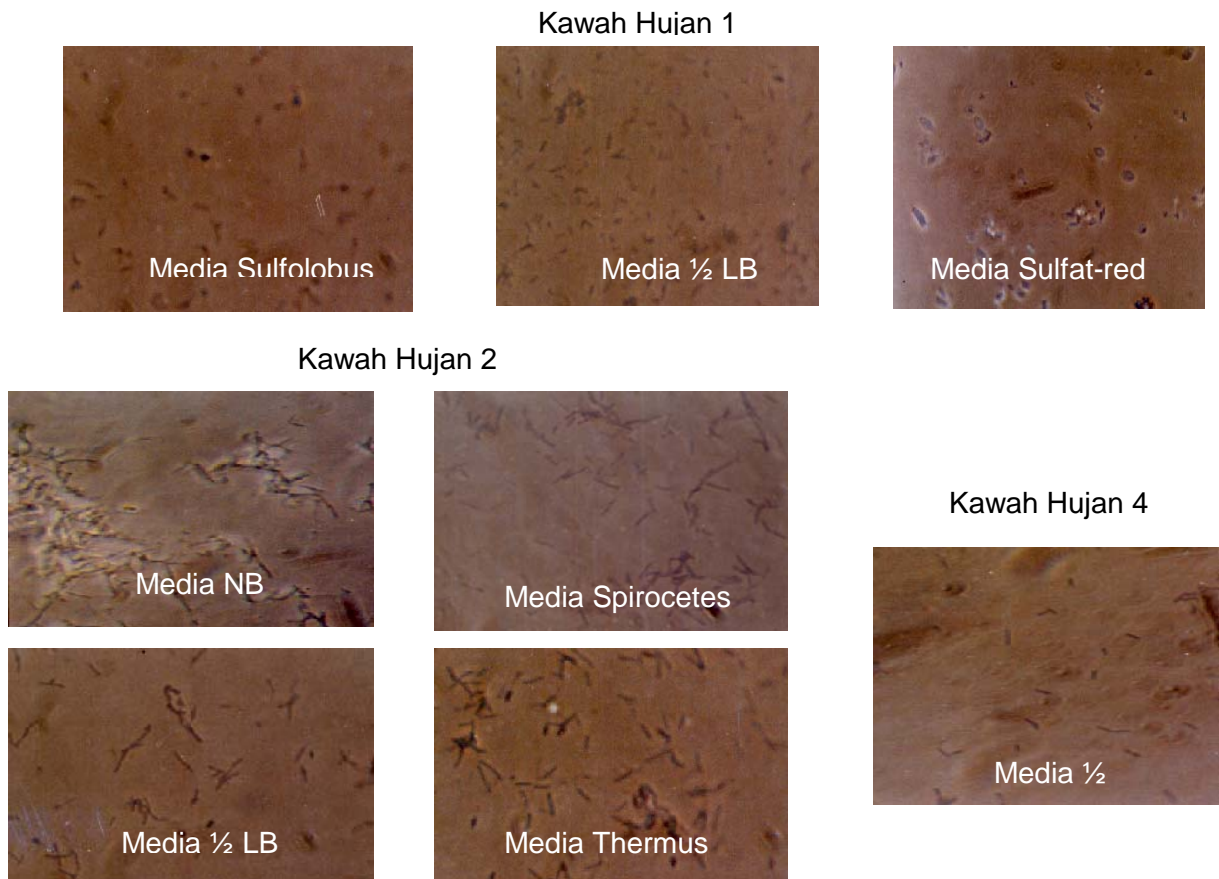
Amplifikasi gen 16S rRNA.

Primer PCR yang digunakan didesain untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dari domain *Bacteria* (Ferris, 1996). Salah satu primer komplemen dengan daerah *conserved* pada domain *Bacteria* (posisi 1055-1070 pada *Escherichia coli*, dengan urutan primer 5'-ATGGCTGTCG TCAGCT-3') dan primer yang lain komplemen dengan daerah *conserved* universal yang dirangkaikan dengan 40 basa *CG clamp* (posisi 1392-1406 pada *E. coli*, dengan urutan 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGGGCCCGGCCCG CCGCCCCCGCCCCACGGGCGGTGTGTAC-3'). Secara teoritis, pasangan primer ini akan mengamplifikasi 323 pb segmen gen 16S rRNA, termasuk daerah V9 yang sangat variabel.

PCR dilakukan dengan menggunakan enzim DNA polimerase *Pfu* sesuai dengan prosedur yang disarankan pabrik (Stratagene, La Jolla, Calif.). Kondisi sari siklus PCR adalah 1 menit denaturasi pada temperatur 94°C, 1 menit annealing, dan 3 menit pemanjangan rantai pada temperatur 72°C. Selama siklus *touchdown* awal, temperatur annealing diturunkan dari 53° sampai 43°C dengan interval 1°C per siklus; 20 siklus annealing selanjutnya dilakukan pada 43°C. Pemanjangan rantai terakhir dilakukan selama 10 menit. Hasil PCR diamati cara elektroforesis pada gel agarosa dengan etidium bromida sebagai penanda.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, biodiversitas mikroba pada Kawah Hujan diamati melalui dua cara, yaitu cara langsung dan dengan kultivasi. Pengamatan mikroba dengan cara langsung dilakukan dengan mengisolasi mikroba langsung dari air kawah dengan cara filtrasi menggunakan membran berukuran 0,22 mikron. Bagian yang tersaring membran maupun endapan (lumpur) kemudian diperlakukan sebagai sampel mikroba dan dianalisis dengan cara isolasi DNA kromosom,



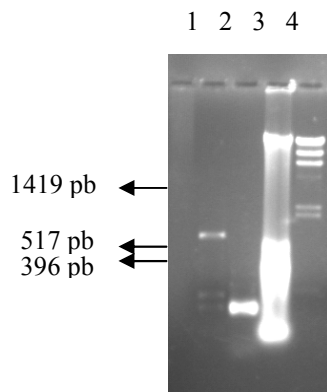
Gambar 1. Bentuk mikroba yang berhasil dikulturkan dari Kawah Hujan

amplifikasi daerah gen 16S rRNA dan analisis DGGE. DNA kromosom mikroba dari kedua bagian tersebut dapat diisolasi. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian mikroba ikut terendapkan ketika dilakukan pengendapan lumpur.

Dengan metoda isolasi kromosom yang digunakan, pita DNA yang diperoleh relatif tipis dan tingkat kemurniannya masih rendah, dilihat dari warna ekstrak kasar DNA yang kecoklatan dan masih terdapat endapan protein. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan terhadap semua sampel DNA dan tidak diperoleh produk PCR. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Zhou dkk. (1996), tingkat kemurnian DNA kromosom yang diisolasi dari tanah (lumpur) mempengaruhi keberhasilan amplifikasi. Adanya senyawa-senyawa organik tanah (*humic substances*) yang ikut terekstraksi menghambat enzim DNA polimerase yang digunakan dalam proses PCR. Selain itu, kemungkinan masih adanya Dnase dalam ekstrak kasar DNA juga mempengaruhi

keberhasilan amplifikasi. Untuk itu, pemurnian DNA kromosom perlu dilakukan lebih lanjut.

Kultivasi mikroba isolat Kawah Hujan berhasil dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis media sintetik. Dari Kawah Hujan 1, mikroba berhasil dikulturkan dalam media 1/2 LB, media Sulfolobus (Atlas, 1993), dan media pereduksi-sulfat (Atlas, 1993). Dari Kawah Hujan 2 diperoleh kultur dalam media sintetik Termus (Castenhold D; 0,1 % yeast ekstrak dan tripton), 1/2 LB, NB, dan media Spirocetes (Atlas, 1993), sedangkan dari Kawah Hujan 4 diperoleh kultur dalam media sintetik 1/2 LB. Pada umumnya, mikroba yang berhasil dikulturkan adalah bakteri berbentuk batang (Gambar 1). Beberapa kultur mikroba tersebut telah berhasil dimurnikan. Mikroba yang tumbuh dalam media Termus Kawah Hujan 2 dengan suhu pertumbuhan 70° C, paling sedikit terdiri dari 2 jenis mikroba dilihat dari perbedaan bentuk koloni dan juga morfologinya ketika dilihat di bawah mikroskop. Bentuk koloni yang berbeda teramati pula pada mikroba yang tumbuh pada



Gambar 2. Elektroforegram DNA.
1. marker pUC 19/*Hinf*I; 2. Produk PCR; 3. DNA Kromosom; 4. Marker DNA λ /*Hind* III

media Spirocetes Kawah Hujan 2. Mikroba-mikroba yang berada dalam media Termus maupun Spirocetes Kawah Hujan 2 tidak tumbuh ketika diinkubasi pada temperatur 37°C, sehingga kemungkinan besar mikroba-mikroba tersebut merupakan kelompok termofilik.

Produk PCR telah diperoleh dari amplifikasi DNA kromosom kultur mikroba yang tumbuh dalam media Termus Kawah Hujan 2. Hasil amplifikasi memiliki ukuran sekitar 390 pb (Gambar 2). Ukuran yang diharapkan untuk hasil amplifikasi daerah gen 16S rRNA yang diamplifikasi adalah sekitar 362 pb. Produk amplifikasi dengan ukuran yang sama juga diperoleh dari hasil amplifikasi DNA kromosom mikroba yang telah dimurnikan.

4. Kesimpulan

Mikroba termofilik isolat Kawah Hujan telah berhasil dikulturkan dalam beberapa media sintetik. Beberapa diantaranya sudah berhasil dimurnikan dan diamplifikasi daerah gen 16S rRNA-nya untuk dilanjutkan dengan analisis DGGE. Sedangkan DNA kromosom hasil isolasi langsung belum bisa diamplifikasi karena tingkat kemurnian DNA-nya yang masih rendah.

5. Daftar Pustaka

Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Shleifer (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1): 143-169.

Atlas, R.M. (1993) Handbook of Microbiological Media. Edited by L.C. Parker. CRC Press.

Baker, G.C., S. Ghaffar, D.A. Cowan, A.R. Suharto (2001) Bacterial Community analysis of Indonesian

hot springs. *FEMS Microbiology Letters.* 200: 103-109.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994), 9th edition, edited by John K. Holt (*et.al.*), Williams & Wilkins, USA.

Egert, M., and M.W. Friedrich (2003) Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragment, a PCR-Related Bias Affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Microbial Community Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5): 2555-2562.

Ferris, M.J., G. Muyzer, and D.M. Ward (1996) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2): 340-346.

Ferris, M.J., S.C. Nold, N.P. Revsbech, and D.M. Ward (1997) Population Structure and Physiological Changes within a Hot Spring Microbial Mat Community following Disturbance. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4):1367-1374.

Huber, R., H. Huber, and K.O. Stetter (2000) Toward the ecology of hyperthermophile: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiology Review* 24: 615-623.

Klijin, N., A.H. Weerkamp, W.M. De Vos (1991) Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction-Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(21): 3390-3391.

Kusumadinata, K (1979) Data Dasar Gunung Api Indonesia (Catalogue of References on Indonesian Volcanoes with Eruptions in Historical Time). Direktorat Vulkanologi, Direktorat Pertambangan Dasar, Departemen Pertambangan dan Energi RI, Bandung.

H. Yohandini, F. Madayanti, P. Aditiawati, dan Akhmaloka

- Pace, N.R. (1997) A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*. 276: 734-740.
- Raysenbach, A.L., M. Ehringer, K. Hershberger (2000) Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the Aquificales and "Korarchaeota" coexist. *Extremophile*. 4: 61-67.
- Raysenbach, A.L., and S.L. Cady (2001) Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *TRENDS in Microbiology*. 9(2): 79-86.
- Vielle, C., and G.J. Zeikus (2001) Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(1): 1-43.
- Ward, D.M., M.J. Ferris, S.J. Nold, and M.M. Bateson (1998) A Natural View of Microbial Diversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1353-1370.
- Zhou, J, M.A. Bruns, and J.M. Tiedje (1996) DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2): 316-322.

Pengaturan Sifat Hidrofilik dan Hidrofobik Membran Silika MCM-41 dan MCM-48

Hens Saputra, Anwar Mustafa dan Mochamad Rosjidi

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Industri Proses BPPT
Lt.9 Gd.2 BPPT Jl. M.H. Thamrin 8 Jakarta 10340 Indonesia
e-mail: henssaputra@yahoo.com

Abstrak

The MCM-41 and MCM-48 membranes were prepared by hydrothermal method on the alpha alumina support by using surfactant (C16TAB) as a template, tetraethylortosilicate (TEOS), deionized water and NaOH. In general the hydrophilic membrane was able to be changed to hydrophobic membrane by employing a silylation process. The process had been carried out at 120 °C during 2 hours. The membranes produced were characterized by X-ray diffraction, gas permeation, and permoporometry. They have a narrow pore size distribution and similar Kelvin diameter about 2,4 nm. The permeation mechanism of pure gases is considered to obey the Knudsen diffusion and no contribution of viscous flow occurred to the total permeation.

Kata kunci: *Hydrophilic, Hydrophobic, M41S, Silica membrane, Vapor Infiltration.*

1. Pendahuluan

Berdasarkan bahan baku yang digunakan, membran sintesis dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu membran organik dan anorganik. Membran organik adalah membran yang dibuat dari bahan-bahan seperti polimer, kompon, dll. Membran anorganik merupakan membran yang dibuat dari bahan-bahan anorganik seperti keramik, zeolit, logam, dll. Membran polimer sudah lebih dahulu dikembangkan dan diaplikasikan pada skala komersial karena lebih mudah disintesis dengan biaya produksi yang relatif lebih murah dibandingkan dengan membran anorganik. Tetapi terdapat keterbatasan pada waktu aplikasinya yaitu mudah rusak terhadap pelarut organik dan bahan kimia. Akhir-akhir ini banyak peneliti yang berupaya mengembangkan membran anorganik. Karakteristik membran anorganik yang menarik antara lain strukturnya yang keras dan pori yang seragam, sangat stabil terhadap pelarut organik dan bahan kimia serta stabil pada temperatur yang tinggi.

Sejak ditemukan material berpori kelompok struktur M41S oleh peneliti dari Mobil Oil Company Amerika Serikat, perkembangan ilmu

material menjadi sangat pesat. Dampaknya dapat dirasakan memicu perkembangan yang pesat pada bidang pembuatan membran anorganik. Keunikan material berpori tersebut adalah luas permukaan (*specific surface area*) dan volume pori yang fantastik yaitu masing-masing mencapai $\pm 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ dan $1,03 \text{ m}^3/\text{g}$.

Struktur M41S terdiri dari struktur heksagonal (MCM-41) dan struktur kubik (MCM-48). Material dengan struktur MCM-41 memiliki sistem aliran satu arah, sedangkan MCM-48 memiliki sistem aliran tiga dimensi. Sebagai material membran sangat menarik, karena dengan adanya struktur (aliran arah x, y dan z pada satu sistem) tersebut apabila terjadi buntu, maka aliran dapat mengalir pada arah lain. Proses pembuatannya sangat dipengaruhi oleh konsentrasi surfaktan, yaitu perbandingan Si dan surfaktan serta perbandingan Si dengan katalis NaOH (Saputra et.al 2003).

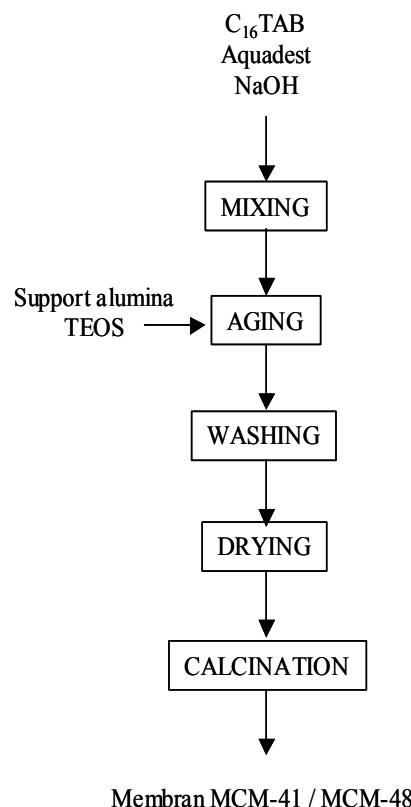
Sifat dasar membran silika dengan struktur MCM-41 dan MCM-48 adalah hidrofilik, sehingga sangat mendukung untuk memisahkan komponen-komponen yang bersifat polar, tetapi silika dapat rusak karena adanya aliran air, karena dapat larut sekitar 100 ppm. Salah

satu upaya antisipasi terhadap hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan pengaturan sifat hidrophilik menjadi hidrophobik. Proses merubah sifat hidrophilik menjadi hidrophobik dilakukan dengan cara mensubstitusi gugus hidroksil pada daerah sekitar pori menjadi gugus alkil yang lebih stabil dengan metode *vapour infiltration* menggunakan *trimethyl chlorosilane*.

2. Percobaan

Membran silika dengan struktur MCM-41 dan MCM-48 dibuat di atas support berupa alpha alumina. Support tersebut memiliki pori dengan sistem asimetris. Pada bagian paling atas merupakan pori yang memiliki diameter terkecil, yaitu 100 nm. Sebelum dilakukan pembuatan membran terlebih dahulu disiapkan larutan induk yang sangat berpengaruh pada struktur membran yang akan dihasilkan. Untuk membran dengan struktur MCM-41 digunakan larutan induk dengan molar rasio . Sedangkan membran silika MCM-48 dibuat dari larutan induk dengan molar rasio 1 TEOS : 0,6 C16TAB : 0,5 NaOH : 95 H2O. Proses pembuatan kedua jenis membran tersebut dapat dijelaskan melalui gambar 1.

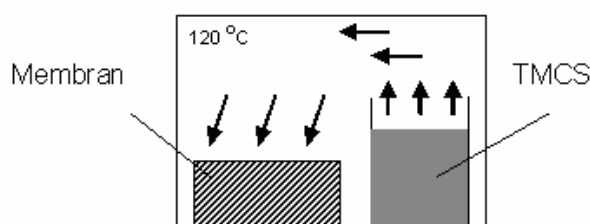
Pada Gambar 1. terlihat tahapan proses pembuatan membran MCM-41 dan MCM-48. Mula-mula surfaktan yang digunakan yaitu Cethyl trimethyl ammonium bromida (C₁₆TAB) dilarutkan dalam aquadest dan NaOH sebagai katalisnya. Campuran tersebut diaduk sampai homogen, pada temperatur ruangan, kecepatan 250 rpm, selama 30 menit. Kemudian dimasukkan support alpha alumina bersama dengan Tetra Ethyl Orto Silicate (TEOS) sebagai sumber Si. Selanjutnya campuran tersebut dimasukkan dalam autoclave agar terjadi reaksi pada temperatur 150 °C selama 24 jam. Selanjutnya membran dikeluarkan dari autoclave dan dicuci dengan aquadest, kemudian dikeringkan pada temperatur 90 °C. Untuk menguraikan template organik dilakukan



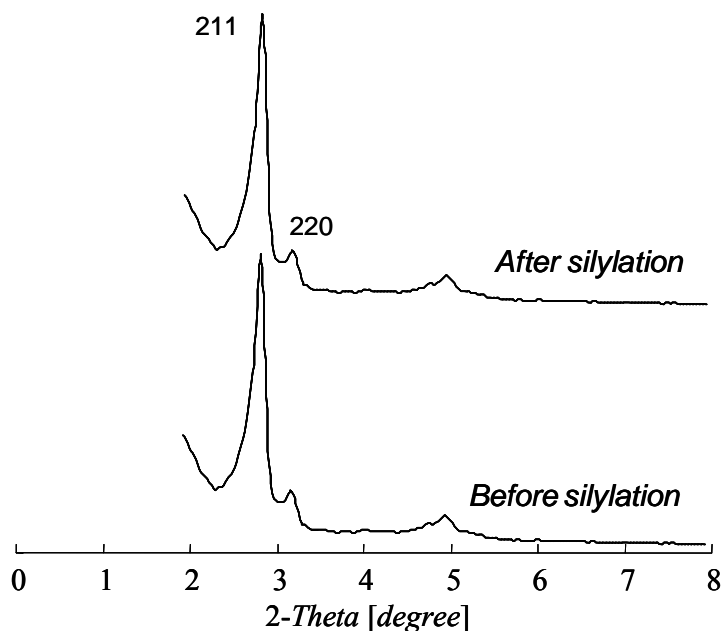
Gambar 1. Diagram proses pembuatan membran silika MCM-41 dan MCM-48

proses kalsinasi pada temperatur 600 °C selama 1 jam. Membran yang dihasilkan baik MCM-41 maupun MCM-48 bersifat hidrophilik. Untuk mengubah sifat hidrophilik menjadi hidrophobik adalah dengan cara *vapour infiltration* menggunakan *trimethyl chlorosilane* (TMCS) pada temperatur 120 °C selama 2 jam. Proses vapor infiltration dilakukan dalam *vessel* tertutup sebagaimana terlihat pada gambar 2.

Karakterisasi membran yang dihasilkan dilakukan menggunakan *X-ray diffraction* (XRD) untuk mengetahui morfologi membran, sebelum dan sesudah proses vapor infiltration. Gas permeasi dilakukan untuk mengetahui



Gambar 2. Proses Vapor Infiltration



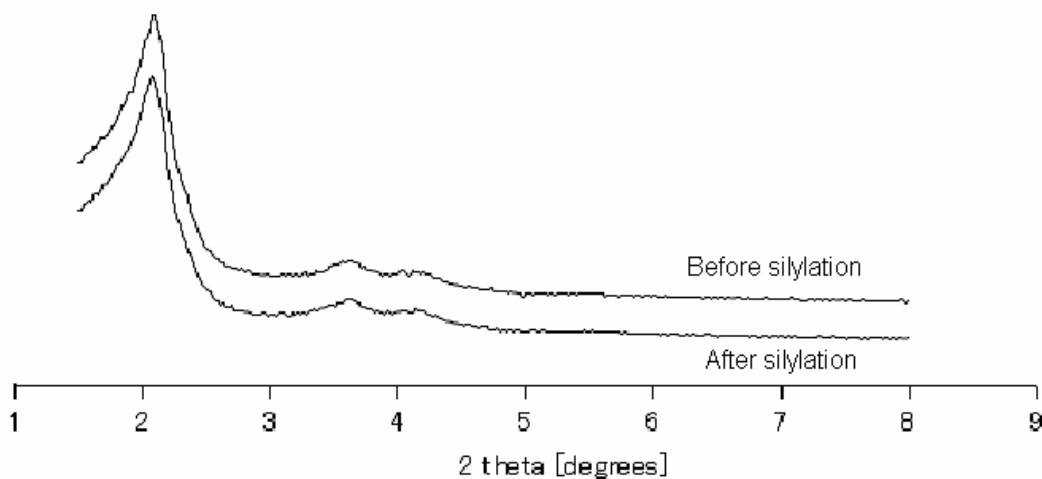
Gambar 3. Grafik XRD membran MCM-48 sebelum dan sesudah sililasi

permeabilitas beberapa gas murni. Selain itu data yang diperoleh dapat juga digunakan untuk mengetahui apakah membran dalam kondisi baik / tidak terjadi kerusakan akibat retak atau adanya *pinhole*. Uji gas permeasi tersebut dilakukan pada membran yang baru dihasilkan (sebelum dikalsinasi) dan sesudah kalsinasi. Untuk mengetahui distribusi ukuran pori, dilakukan uji permporometry. Pengujian ini dilakukan menggunakan gas nitrogen dan uap air yang diatur tekanan relatifnya (P/P_0) mulai dari 0 hingga 1. Kemudian dianalisis menggunakan gas kromatografi secara online. Dalam rangka mengetahui sifat hidrophilik dan hidrophobik secara visual, dilakukan uji tetes

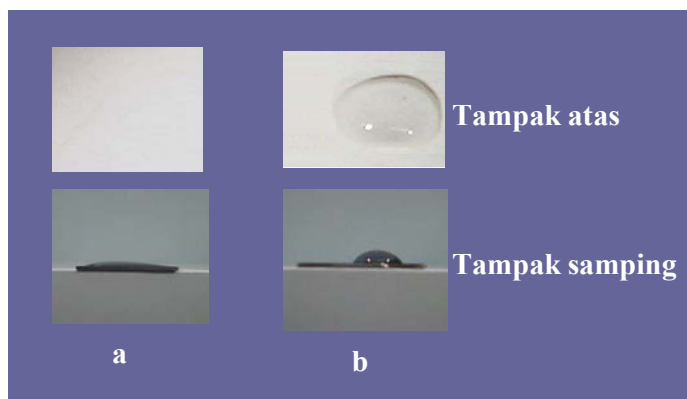
air pada permukaan membran.

3. Hasil dan pembahasan

Hasil analisis menggunakan XRD adalah sebagaimana terlihat pada gambar 3 dan 4. Gambar 3 adalah grafik XRD untuk membran silika dengan struktur MCM-48 sebelum dan sesudah proses sililasi, dimana sebelum proses sililasi membran bersifat hidrophilik dan setelah sililasi berubah menjadi hidrophobik. Berdasarkan grafik XRD terlihat bahwa tidak terjadi perubahan struktur, ditunjukkan oleh intensitas yang tetap tinggi. Adanya pergeseran posisi grafik (211) adalah disebabkan oleh perubahan ukuran pori akibat adanya substitusi gugus hidroksil dengan gugul alkil yang berasal



Gambar 4. Grafik XRD membran MCM-41 sebelum dan sesudah sililasi

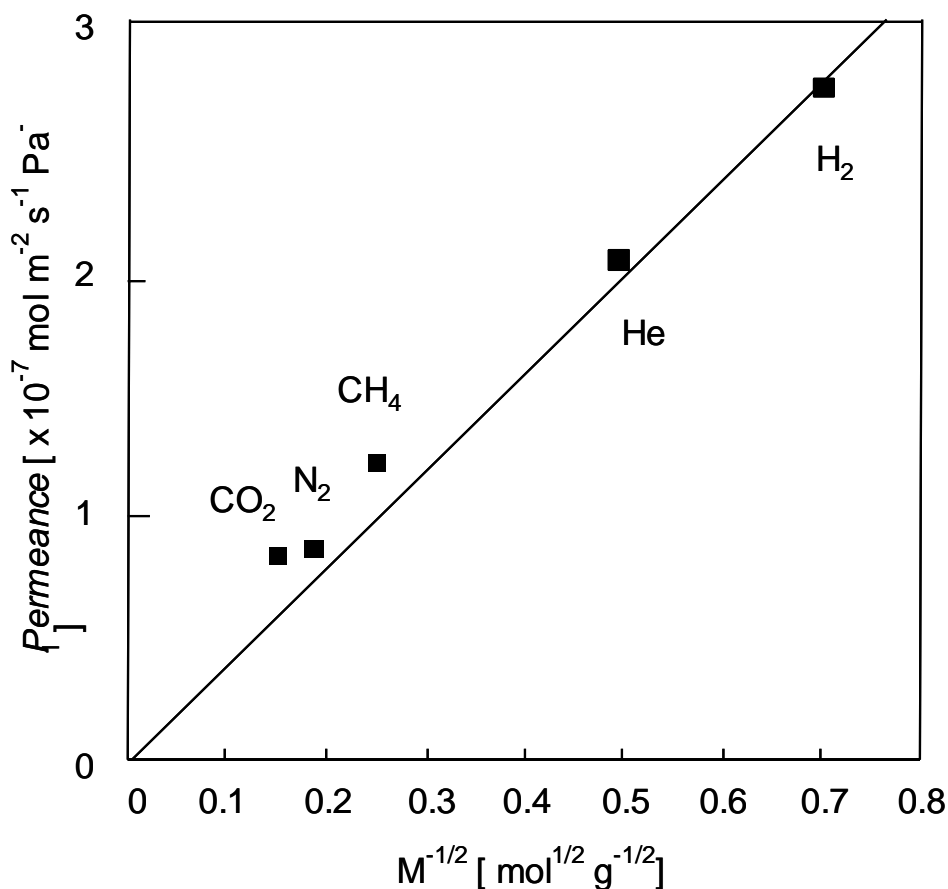


Gambar 5. Uji tetes air pada membran : a. hidrophilik, b. hidrophobik

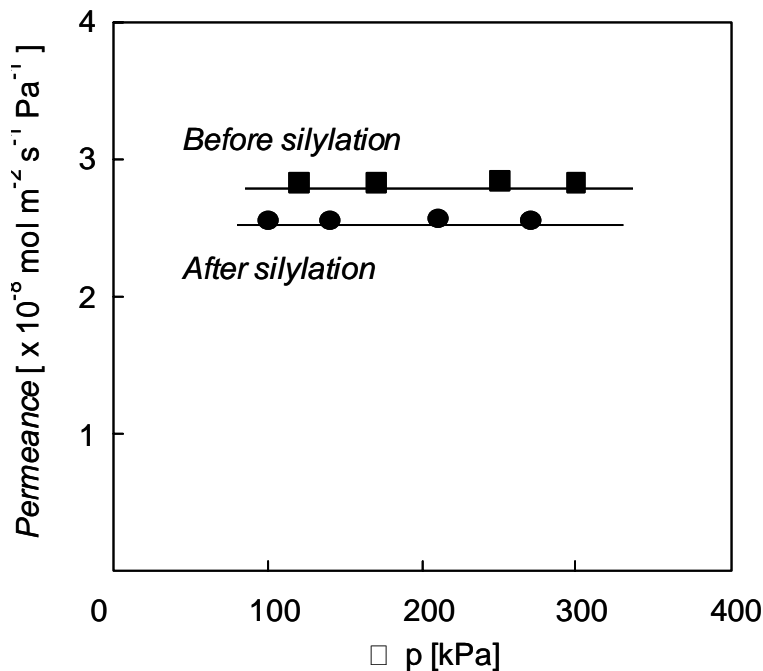
dari trimethyl chlorosilane. Proses tersebut mengakibatkan diameter pori mengecil sekitar 0,5 nm. Hal yang serupa terjadi pada membran MCM-41 seperti terlihat pada gambar 4.

Uji tetes air pada kedua membran menunjukkan hasil bahwa sebagian air terserap di daerah sekitar permukaan membran yang bersifat hidrophilik (Gambar 5.a). Pada membran hidrophobik (Gambar 5.b), air tidak dapat meresap ke dalam membran. Gugus $-OH$ yang berasal dari $Si-OH$ atau $Al-OH$ pada daerah

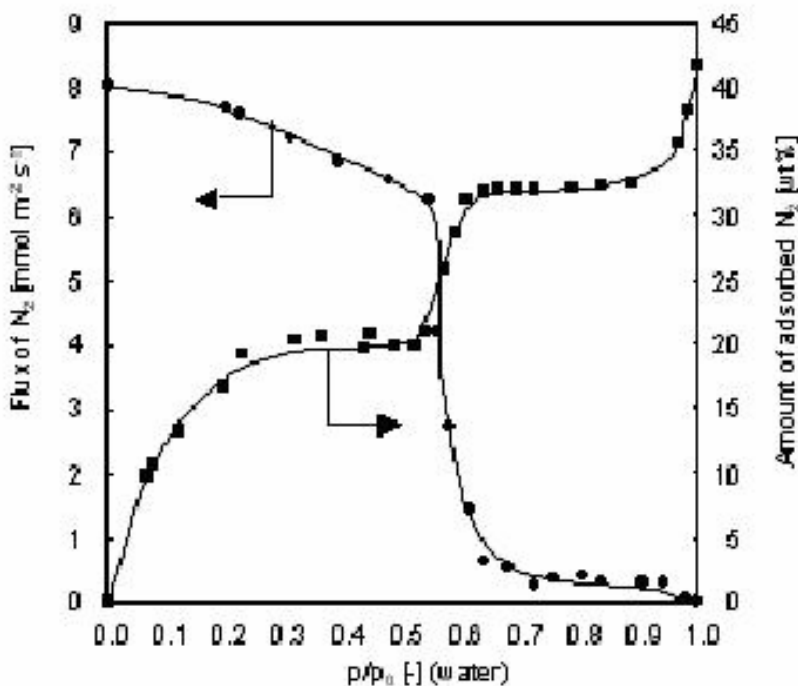
sekitar pori membran telah disubstitusi dengan gugus $-CH_3$ yang berasal dari trimethyl chlorosilane. Pembuktian lebih kuat dengan cara melewati gas *carrier* (He) yang telah jenuh dengan uap air pada membran dan dianalisis secara *online* menggunakan gas kromatografi. Pada membran silika hidrophilik MCM-41 maupun MCM-48 terdeteksi adanya uap air yang melewati membran. Sedangkan membran yang telah dilakukan proses sililasi berubah menjadi hidrophobik dan tidak



Gambar 6. Permeasi beberapa gas murni terhadap membran setelah kalsinasi



Gambar 7. Permeasi gas Nitrogen pada membran sebelum dan sesudah sililasi



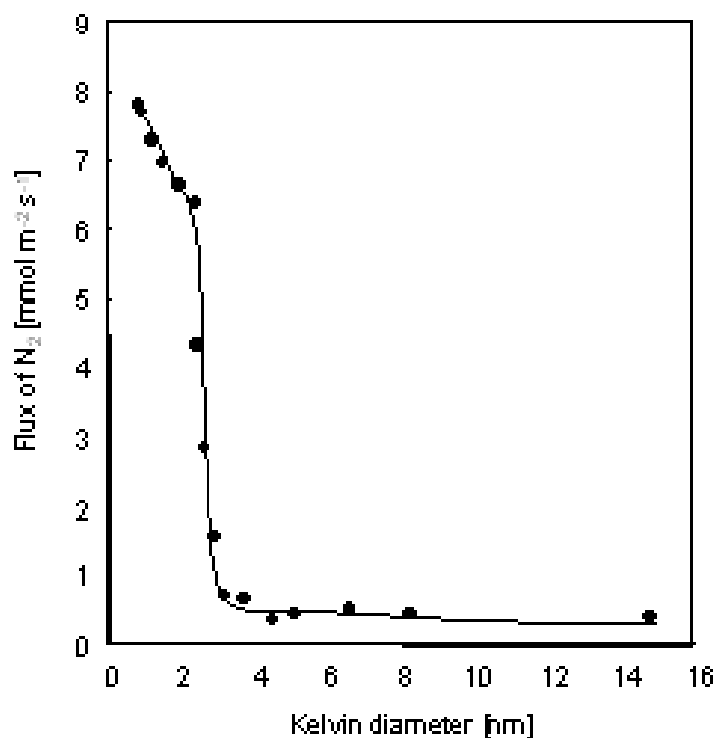
Gambar 8. Permporometry dan adsorpsi pada membran silika

terdeteksi adanya uap air yang melewati membran.

Analisis gas permeasi pada membran yang baru dihasilkan (sebelum dilakukan proses kalsinasi), menunjukkan hasil bahwa tidak ada gas yang melewati membran. Pada tahap ini dapat disimpulkan bahwa membran dalam

keadaan tertutup sempurna oleh molekul-molekul surfaktan. Dengan kata lain tidak terdeteksi adanya kerusakan akibat retak atau *pinhole*. Hasil permeasi beberapa gas murni dapat dilihat pada gambar 6.

Gambar 6 memperlihatkan grafik hubungan antara fungsi akar pangkat dua dari berat



Gambar 9. Distribusi ukuran pori aktif membran silika

molekul beberapa gas murni terhadap permeasinya melalui membran setelah kalsinasi. Hasil tersebut menginformasikan bahwa mekanisme transport gas-gas tersebut sesuai dengan difusi Knudsen dan tidak terlihat adanya aliran *viscous*, sehingga dapat diprediksi bahwa tidak ada *pinhole* pada membran tersebut. Adapun permeasi gas nitrogen pada membran sebelum dan sesudah proses sililasi terlihat pada gambar 7.

Uji permporometry dilakukan untuk menganalisis pori aktif membran. Prinsip kerjanya adalah mengontrol *noncondensable gas* pada uap yang terkondensasi di celah kapiler. Hasilnya dapat ditampilkan dalam bentuk grafik seperti terlihat pada gambar 8.

Pada gambar 8 terlihat bahwa penurunan flux Nitrogen yang tajam terjadi pada tekanan uap relatif P/P_0 air 0,5 - 0,6. Hanya ada satu penurunan grafik yang tajam, artinya distribusi ukuran pori membran sempit atau tidak terlihat adanya *pinhole*. Berdasarkan data tersebut, diameter Kelvin dapat dihitung. Distribusi ukuran pori dapat dilihat pada gambar 9, diameter rata-rata adalah sekitar 2,5 nm.

4. Kesimpulan

Sifat hidrophilik dan hidrophobik membran silika dengan struktur heksagonal (MCM-41) dan kubik (MCM-48) dapat diatur dengan metode *vapor infiltration* menggunakan *trimethyl chlorosilane*. Proses tersebut disebut juga sebagai proses sililasi. Proses sililasi tidak berpengaruh pada struktur pori, tetapi dapat memperkecil ukuran pori sebesar $\pm 0,5$ nm. Mekanisme transport gas-gas murni melalui membran silika tersebut sesuai dengan kaidah difusi Knudsen dan tidak terlihat adanya aliran *viscous*. Distribusi ukuran pori membran adalah sempit dengan diameter Kelvin sekitar 2,5 nm.

5. Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada BPPT atas dukungannya sehingga dapat dilaksanakan penelitian ini dan kepada semua pihak yang telah membantu terselesainya tulisan ilmiah ini.

6. Daftar Pustaka

Anuradha, T.V., and Tanganathan, (1999), S., *Synthesis of mesoporous materials based on titanium(IV)oxide and titanium nitride*, Nanostructure material, (12), 1063-1069.

- Burggraaf A.J., L. Cot, (1996), *Fundamentals of Inorganic Membrane Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam.
- Gestel, T.V., Vandecasteele, C., Buekenhoudt, A., Dotremont, C., Luyten, J., Leysen, R., Bruggen, Maes, (2002), G., *Alumina and titania multilayer membranes for nanofiltration : preparation, characterization and chemical stability*, Journal of Membrane Science, (5268), 1-17.
- Gilron, J, A. Soffer, (2002), *Knudsen in microporous carbon membranes with molecular sieving character*, Journal of Membrane Science, (210), 339-352.
- Hoppe, R., A. Ortlam, J. Rathousky, G. Schulz-Ekloff, A. Zukal, (1997), *Synthesis of titanium-containing MCM-41 mesoporous molecular sieves in the presence of zinc phthalocyanine and rhodamine B*, Microporous Material, (8), 267-273.
- Huang P., N. Xu, J. Shi, Y.S. Lin, (1996), *Characterization of asymmetric ceramic membranes by modified permoporometry*, Journal of Membrane Science, (116), 301-315.
- Kaneko D., (1994), *Review determination of pore size and pore size distribution 1. adsorbent and catalysis*, Journal of Membrane Science, (96), 91-130.
- Kresge, C.T., M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, (1992), *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism*, Nature (359), 710-712.
- Lee, D., S.T. Oyama, (2002), *Gas permeation characteristics of a hydrogen selective supported silica membrane*, Journal of Membrane Science, (210), 291-306.
- Lira, H.L., R. Peterson, (2002), *New and modified anodic alumina membranes part III. Preparation and characterization by gas diffusion of 5 nm pore size anodic alumina membranes*, Journal of Membrane Science, (143), 375-387.
- Nakao W.I., (1994), *Determination of pore size and pore size distribution 2. dialysis membranes*, Journal of Membrane Science, (96), 131-136.
- Nishiyama, N., A. Koide, Y. Egashira, K. Ueyama, (1998), *Mesoporous MCM-48 membrane synthesized on a porous stainless steel support*, Chem. Commun, 2147-2148
- Nishiyama, N., D.H. Park, A. Koide, (2001), *A mesoporous silica (MCM-48) membrane: preparation and characterization*, J. mem. Sci. 182, 235-244.
- Nishiyama, N., Saputra, H., Park, D.H., Egashira, Y., Ueyama, K., (2003), *Zirconium-containing Mesoporous Silica Zr-MCM-48 for Alkali Resistant Filtration Membranes*, Journal of Membrane Science, (218), 165-171.
- Saputra, H., (2003), *Synthesis and Characterization of Zirconium-containing Nanoporous Silica Membranes*, Master Thesis, Osaka University, Osaka, Japan.
- Saputra, H., (2002), *Penelitian Pembuatan Membran Silikat Sistem Aliran Tiga Dimensi (MCM-48)*, Pengkajian Industri, 18 (VII), 87-92.
- Saputra, H., Rosjidi, M., (2002), *Alat Permporometry untuk Analisis Distribusi Ukuran Pori Aktif Membran*, Pengkajian Industri, 16(VII), 86-91.
- Tsuru, T., Hino, T., Yoshioke, D., Asaeda, M., (2001). *Permporometry characterization of microporous ceramic membranes*, Journal of Membrane Science, (96), 131-165.



Isolation and Identification of Non Polar Compounds from Stem Bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn

Hery Suwito*, Mulyadi Tanjung, Alfinda Novi Kristanti, Mamik M Q

Dept. of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Airlangga University, Surabaya-Indonesia
Email*: herys08032002@yahoo.com.

Abstract

Stigmaterol and 18 Sesquiterpenes were isolated from the n-hexane extract of the stem bark of Saccopetalum horsfieldii Benn. The sesquiterpene components were α -Cubeben, α -Ylangen, Copaen, β -Elemen, Calaren, α -Bergamoten, α -Humulen, Alloaromadendren, β -Muurolen, Caryophylen, γ -Cadinen, Calamanen, α -Muurolen, 3,4-dihydro-5-ethyl-1-tetralone, Caryophylenoxide, Humuleneoxide, α -Calarocene, (4- β)-verrucarol trihotec-9-ene. The molecular structures of sesquiterpenes were analyzed by GC-MS and compared to library data. The structures of stigmaterol was elucidated on the basis of spectral evidence.

Key words: *Saccopetalum horsfieldii* Benn, sesquiterpenes, stigmaterol.

1. Introduction

Annonaceae is a family of plants which grow in tropical and sub tropical regions. This family consists of 130 genera and more than 2000 species. In Indonesia there are more than 20 genera and 40 species (Heyne, 1987). Genera in the family Annonaceae which have been researched are *Annona*, *Guatteria*, *Artabotrys*, *Goniothalamus*, *Polyalthia*, *Uvaria*, *Asimina*, and *Xylopia*. Generally, chemical compounds found in the above species are terpenoid, steroid, alkaloid, acetogenin and flavonoid (Hakim, 2001). Chemical compounds isolated in Annonaceae exhibit physiological activities, such as anti tumor, anti microbe, and anti cancer properties (Zhe-ming, et al., 1992).

Saccopetalum is a genus of Annonaceae. Usually it consists of essential oil and alkaloid. Essential oil has been isolated from *Saccopetalum tomentosum* (Hegnauer, 1969). *Saccopetalum horsfieldii* Benn is the only species of genus *Saccopetalum* growing in Indonesia and only a small amount of research into this species has been reported.

Preliminary study showed that the n-hexane extract of stem bark of *Saccopetalum*

horsfieldii Benn consisted of terpenoid and steroid possessing toxicity toward *Artemia salina* Leach (Suhartiningsih, 2001). Based on the above reasons, isolation and structure

Identification of chemical components in n-hexane of the stem bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn is reported in this research.

2. Experiment

General

IR spectra were run on an FT-IR Jasco 5300 infrared spectrometer in KBr pellet. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra were taken on a Bruker AM 300 spectrometer using TMS as internal standard and CDCl₃ as solvent. MS spectra were performed on GC-MS Shimadzu QP-5050 and samples were injected on DB3 column, using a flame ionization detector. Analyzed compounds were recorded their retention time and passed through a mass detector. The mass spectrum was analyzed by comparison with library data and PBM (Probability Based Matching). TLC was conducted on silica gel GF 254 (E. Merck). Melting point was measured on Fisher John melting point apparatus. Separation was performed on silica gel G 60 (E. Merck) column.

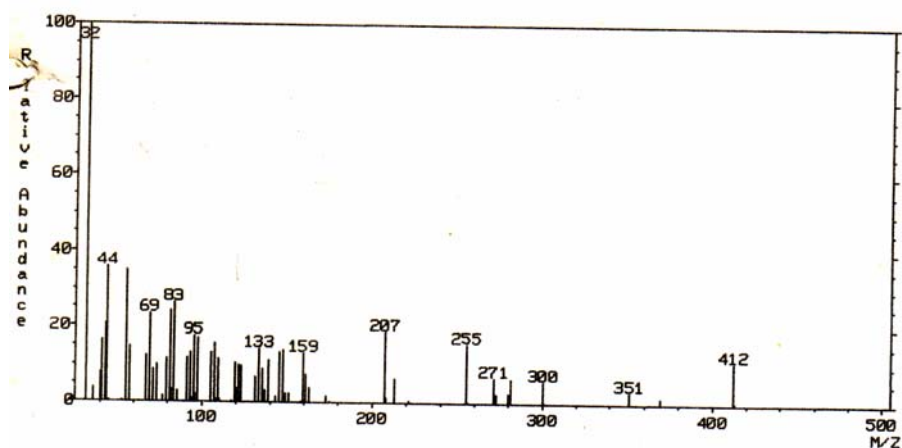


Figure 1 The mass spectrum of the isolated crystal

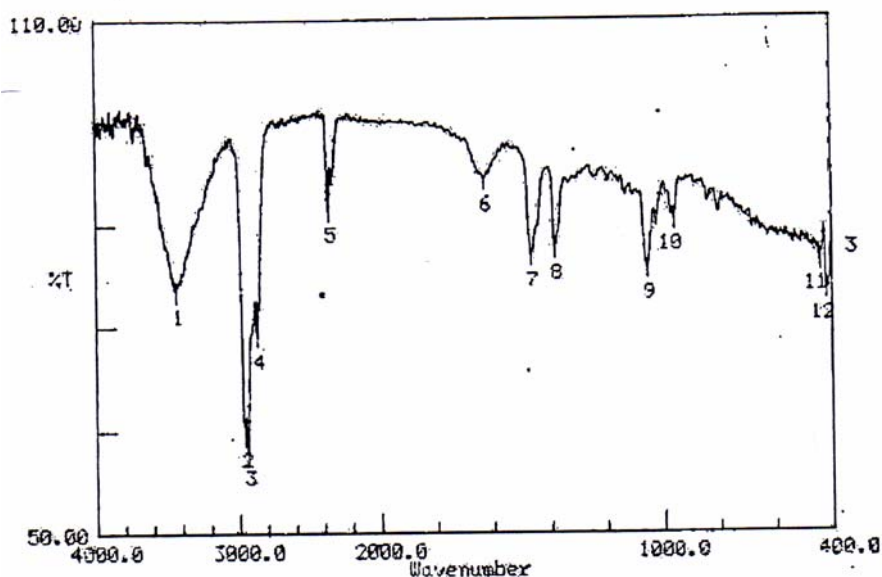


Figure 2 The IR spectrum of the isolated crystal

Isolation

The dried powder of *Saccopetalum horsfieldii* Benn (4 kg) was macerated twice with each 8 L methanol for 5 – 6 days and gave a crude methanol extract. This extract was then extracted partially with n-hexane 3 times giving a crude n-hexane extract. The n-hexane extract was separated by column chromatography and by flash chromatography and eluted gradiently with dichloromethane – ethyl acetate to provide fraction A and fraction B. Fraction A (11.84 g) was then further separated by vacuum chromatography to provide fraction A₁ (1.34 g) and fraction A₂ (3.74 g). Fraction A₁ was an oily liquid and then analyzed directly on GC-MS.

Fraction A₂ (3.74 g) was a solid, then separated by flash chromatography and eluted with n-hexane: acetone (9:1) a few times to provide a white crystal (173 mg). TLC was conducted to prove the purity using 3 different mixture mobile phases. The melting point was also measured and the molecular structure was determined based on IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra.

3. Results and Discussions

Crystal of fraction A₂: white crystal; Phytochemical screening using Liebermann – Bourchard reagent giving a blue solution; m.p = 136-137 °C; TLC: R_f = 0.30 (n-hexane: ethyl acetate = 8:2), R_f = 0.76 (CHCl₃: methanol = 8:2), R_f = 0.78 (CHCl₃: ethyl acetate = 8:2); IR spectrum (wave number, cm⁻¹): 3441.32,

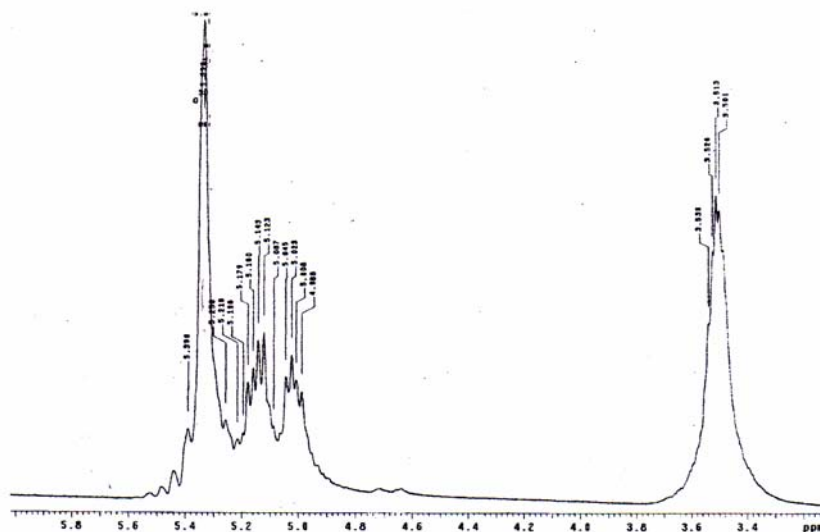


Figure 3 The ^1H -NMR spectrum of the isolated crystal

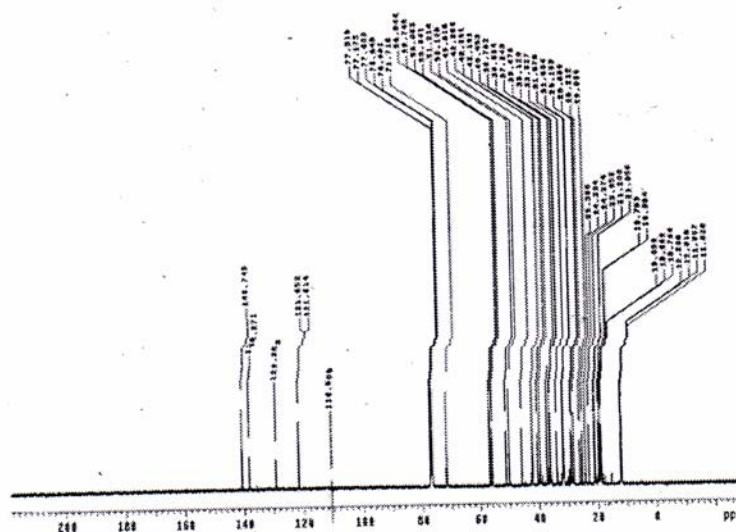


Figure 4 The ^{13}C -NMR spectrum of the isolated crystal

2954.14, 2953.92, 2868.41, 1466.03, and 1055.16; EI-MS m/z : 414 [M^+]; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.23 (m, 4H), 1.64 – 1.67 (m, 12H), 3.51 (s, 1H), 1.95 (m, 2H), 5.34 (m, 1H), 1.85 (s, 1H), 1.01 (s, 2H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.83, 18.76, 19.03, 19.36, 19.79, 21.06, 23.05, 24.27, 26.10, 28.21, 31.88, 33.93, 36.12, 36.46, 37.24, 39.76, 40.45, 42.29, 45.82, 50.13, 56.21, 56.75, 56.76, 56.84, 71.72, 121.61, 129.26, 138.27, 140.75.

Oily liquid of fraction A₁: GC-MS [R_t (minutes), m/z]: 15.075, 204; 15.467, 204; 15.583, 204; 15.758, 204; 16.242, 204; 16.408, 204; 16.817, 204; 17.325, 204; 17.400, 204; 17.492, 204; 17.642, 204; 17.758, 204; 17.950,

204; 18.1, 204; 18.642, 220; 19.017, 220; 19.575, 200; 19.825, 198; 21.058, 266; 21.142, 266.

Discussion

The purity test of the crystal of fraction A₂ was conducted by TLC using 3 different mobile phases and its melting point. For each mobile phase, only one spot was observed on the TLC plate. From both observations, it can be deduced that the isolate crystal was pure.

The EI-MS m/z 414 [M^+], together with the ^1H and ^{13}C NMR spectra prompted the molecular formula $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, supported by the phytochemical screening which indicated that

the isolated compound was a steroid. The mass spectrum is shown in figure 1.

Its IR spectrum displayed vibration peaks at (cm^{-1}) 3441.32, 2953.92 and 16300.00, suggesting the presence of hydroxyl, $-\text{CH}_2-$ and $>\text{C}=\text{C}<$ group. The IR spectrum of the crystal is shown in figure 2.

The presence of the hydroxyl group was also supported by the signal of the ^1H NMR spectrum at δ 3.51 (s) and ^{13}C NMR at δ 71.72

ppm. The ^1H NMR spectrum displayed signals at 2.26 – 1.01 ppm, representing the methylene and methyne group, whereas intensive signals at 0.92 – 0.70 ppm represented the methyl group. The signal at δ 5.34 (m) indicated a proton attached to $\text{C}=\text{C}$ double bond, whereas the signal at δ 5.12 (2H, dd, $J=7.6$ Hz and $J=14.8$ Hz) represented protons attached to double bond ($-\text{CH}=\text{CH}-$) (Friebolin, 1993). The ^1H NMR spectrum of the isolated crystal is displayed in figure 3.

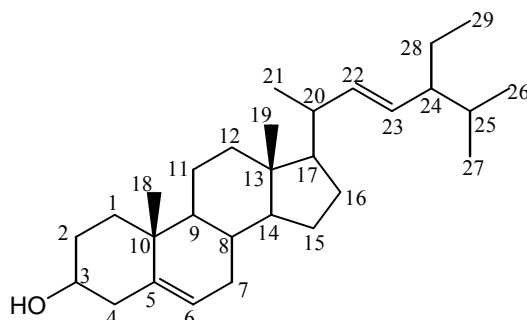


Figure 5. Structure of stigmasterol

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of isolated stigmasterol

Position	Chemical shift δ (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	1.23 (m, 4H)	36.48
2	1.64-1.67 (m, 12H)	39.76
3	3.51 (s, 1H)	71.72
4	1.95 (m, 2H)	50.13
5	-	140.75
6	5.34 (m, 1H)	121.61
7	1.85 (s, 1H)	31.88
8	1.64-1.67 (m, 12H)	28.21
9		45.82
10	-	40.45
11	1.23 (m, 4H)	21.06
12	1.01 (s, 2H)	36.12
13	-	42.29
14	1.64-1.67 (m, 12H)	56.21
15	1.64-1.67 (m, 12H)	24.27
16		23.05
17		56.84
18		19.36
19	0.92 (m, 6H)	19.79
20	2.23 (s, 1H)	37.24
21	0.92 (m, 6H)	56.75
22	5.12 (dd, $J=7.6$ and $J=14.8$ Hz)	129.26
23		138.27
24	1.99 (s, 1H)	56.76
25	1.83 (s, 1H)	33.93
26	0.82 (m, 6H)	18.76
27	-	19.03
28	1.64-1.67 (m, 12H)	26.10
29	0.70 (m, 3H)	11.83

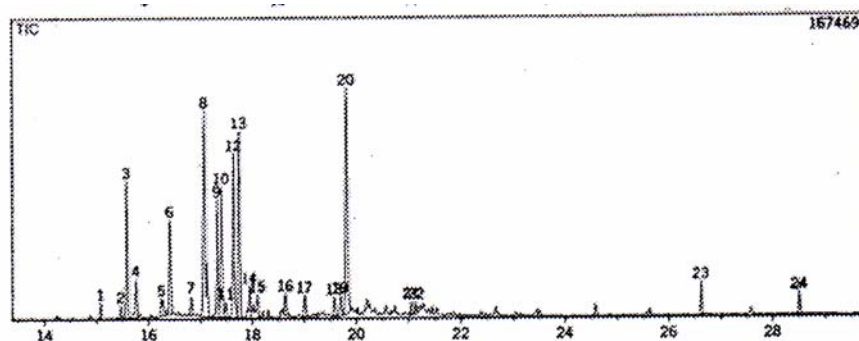


Figure 6 The Chromatogram of fraction A₁

Table 2. The GC-MS data (retention time, name of compound)

No	Name of compound	R _t (minutes)	No	Name of compound	R _t (minutes)
1	α-Cubeben	15.075	10	Caryophyllene	17.492
2	α-Ylangen	15.467	11	γ-Cadinen	17.642
3	Copaen	15.583	12	Calamenen	17.758
4	β-Elementen	15.758	13	α-Muurolen	17.950
5	Calaren	16.242	14	3,4-dihydro-5-ethyl tetralone	18.100
6	α-Bergamoten	16.408	15	Caryophylenoxide	18.642
7	α-Humulen	16.817	16	Humulenoxyde	19.017
8	Alloaromadendren	17.325	17	α-Calacoren	19.575
9	β-Muurolen	17.400	18	(4-β)-verrucarol trihotec-9-en	21.058

Its ¹³C NMR spectrum displayed 29 signals representing 29 carbons (6 primary carbons, 9 secondary carbons, 11 tertiary carbons, and 3 quaternary carbons). Primary carbons were displayed as signals at δ (ppm): 19.36, 19.79, 11.83, 18.76, 19.03, and 11.96. Unconjugated double bond carbons were represented by signals at δ (ppm): 140.75, 121.63, 138.27 and 129.26. The ¹³C-NMR spectrum is displayed in figure 4.

Combining the above evidence, the white isolated crystal was deduced to be stigmasterol. Its structure is described in figure 5.

The ¹H and ¹³C NMR data of isolated stigmasterol are listed in table 1.

The oily liquid of fraction A₁ was analyzed by GC-MS. Their mass spectra were compared to the library data by Probability Based Matching. The chromatogram is displayed in figure 6.

The GC-MS data (retention time, name of compound) are listed in table 2.

4. Conclusion

Stigmasterol and 18 sesquiterpenes were the compounds isolated from the n-hexane extract of stem bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

5. Acknowledgment

The authors acknowledge Dr. Mulya Hadi Santoso of LDB-Unair for spectroscopic measurement of the samples.

6. References

- Friebolin, H., 1993, Basic One- and Two Dimensional NMR Spectroscopy, 2nd.ED., VCH Verlag, Weinheim, pp. 51-66.
- Hakim, E.H.; Achmad, S.A.; Makmur, L, Mujahidin, D., Maolana Syah, Y., 2001, Profil Kimia Annonaceae, Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia), 1, 1-12.
- Hegnauer, R., 1969, Chemotaxonomie der Pflanzen III, Springer-Verlag, Stuttgart, hal. 116 – 123.
- Heyne, K., 1987, Tumbuhan Berguna Indonesia II, Jilid II, Penerbit Sarwana Jaya, Jakarta, hal. 91-99.
- Suhartingsih, A., 2001, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Fraksi n-Heksana dan Fraksi til asetat Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn Terhadap *Artemia salina* Leach dan *Culex fatigans*, Skripsi, Jurusan Kimia FMIPA, Unair, Surabaya.

Hery Suwito, Mulyadi Tanjung, Alfinda Novi Kristanti, Mamik M Q

Zhe-Ming, G., Xin-Ping, F., Riesser, M.J., Yu-Hua, H., Miesbaur, R.I., Smith, L.D., Wood, K.V., McLaughlin, L.J., 1992, New Cytotoxic Annonaceae Acetogenin: Bullatanocine and cis- and trans- Bullatanocinone from *Annona bulata*, *Tetrahedron*, **49**, 747-757.

Sebatian Ditiokarbamat: Kepelbagaian Sintesis dan Kajian Aplikasi

Ibrahim Baba¹⁾, Yang Farina Abdul Aziz²⁾ dan Abdul Hamid Othman³⁾

1) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, MALAYSIA

E-mail: aibi@pkisc.cc.ukm.my / aibi2005@yahoo.com

2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, MALAYSIA

E-mail: farina@pkisc.cc.ukm.my

3) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, MALAYSIA

E-mail: hamie@pkisc.cc.ukm.my

Abstrak

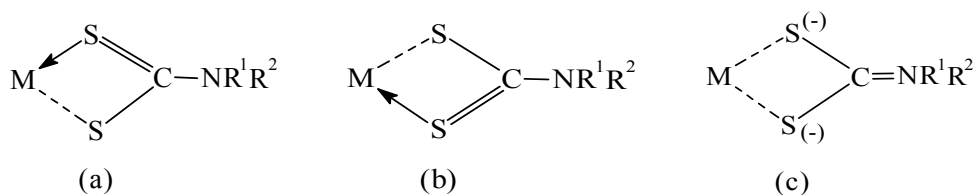
Penyelidikan sebatian ditiokarbamat di UKM telah berjaya menemui pelbagai kaedah sintesis dan sebatian baru daripada pelbagai jenis amina. Lebih daripada dua ratus sebatian ditiokarbamat baru telah berjaya diasingkan menggunakan pelbagai kaedah sintesis dan pencirian untuk mengetahui ketulen dan strukturnya. Sintesis menggunakan kaedah metatesis dan kondensasi telah berjaya menghasilkan sebatian ditiokarbamat daripada jenis $M[S_2CNR'R']_n$ dan $R_nSn[S_2CNR'R']_{4-m}$ (n dan $m = 2$ atau 3 ; $R =$ alkil dan fenil; $R' =$ alkil primer, sekunder atau hidroksi; $R'' =$ alkil primer, sekunder atau hidroksi; $M =$ logam). Di samping itu aduk sebatian ditiokarbamat dengan 2,2'-bipiridil dan 1,10-fenantrolin juga telah berjaya dihasilkan menggunakan kaedah yang sama. Sebatian ditiokarbamat terbitan *N*-metilglisina dengan formula umum $M[S_2CN(CH_3)CH_2COOH]_n$ ($M =$ logam; $n = 2$ atau 3) juga telah berjaya disintesis dan dicirikan yang menunjukkan stoikiometri nisbah logam:ligan adalah 1:2. Di samping itu sebatian organostanum(IV) ditiokarbamat terbitan *N*-metilglisina, alanina dan hidrosiprolina juga telah berjaya disintesis dengan formula umum $R_2Sn[(S_2CNR'CH_2CO_2)]_2$ ($R = CH_3, C_4H_9$ dan C_6H_5 ; $R' = H$ dan CH_3). Secara umumnya, majoriti sebatian ditiokarbamat yang berjaya diasingkan telah menggunakan kaedah kondensasi secara in-situ dalam pelarut etanol, metanol atau air pada suhu rendah. Ujian kestabilan terhadap terma menunjukkan kesemua sebatian ditiokarbamat stabil di bawah suhu $90^\circ C$. Di samping itu lebih daripada lima puluh hablur tunggal sebatian ditiokarbamat telah berjaya diketahui strukturnya dengan menggunakan kaedah kristalografi sinar X. Kajian awal sifat anti-mikrob telah menunjukkan kebanyakan sebatian ditiokarbamat sederhana aktif terhadap beberapa jenis fungi. Ujian sitotoksiti pula menunjukkan sebahagian sebatian ditiokarbamat aktif terhadap sel leukemia HL-60 dengan nilai CD_{50} di bawah $5 \mu g/mL$. Ujian terhadap polimer untuk sifat antioksidan dalam adunan NR:LLDPE terhadap penuaan haba telah menunjukkan pengekal kekuatan tegangan sehingga 60% berbanding kawalan sebanyak 32% selepas penuaan lapan hari dalam ketuhar.

Kata kunci : ditiokarbamat, sintesis dan ujian aplikasi

1. Pendahuluan

Sebatian ditiokarbamat adalah sejenis sebatian tak organik separa amida asid karbonik telah ditemui pada awal sejarah kimia organo-sulfur. Perbincangan awal sebatian ditiokarbamat telah

dilaporkan oleh Thorn dan Ludwig (1962). Satu daripada sifat penting sebatian ditiokarbamat adalah stabil pada nombor koordinatan logam tinggi disebabkan casnya yang rendah dan jarak ikatan yang pendek (2.8-2.9 Å). Sifat istimewa



Rajah 1. Tiga mod pengikatan sebatian ditiokarbamat.

sebatian ditiokarbamat adalah kebolehan atom sulfur membentuk ikatan berganda disebabkan kewujudan orbital $d\pi$ kosong dalam sulfur.

Anion ditiokarbamat, $R^1R^2NCS_2^-$ adalah sejenis bes lemah dan boleh bertindak sebagai ligan dwisulfur. Ia bertindak sebagai ligan kelat bidentat walaupun terdapat kekuatan ikatan yang tidak setara daripada kedua-dua atom sulfur kepada logam (Radha *et al.*, 1986). Kekuatan pengkelatan atom sulfur kepada logam bergantung pada kumpulan R^1 dan R^2 .

Ditiokarbamat boleh berikat dalam pelbagai bentuk mod melalui atom sulfur, iaitu secara monodentat, bidentat simetri dan bidentat asimetri (Okamoto *et al.*, 1993). Terdapat beberapa bentuk struktur resonans kumpulan ditiokarbamat, $M[S_2CNR_2]_n$ (M = logam dan n = keadaan pengoksidaan). Pelbagai mod pengikatan mungkin terbentuk daripada sebatian ditiokarbamat seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1.

Mengikut statistik tahun 2004 daripada sumber *U.S. Trade Quick-Reference Tables: December 2004 Import* menunjukkan jumlah kuantiti penggunaan sebatian ditiokarbamat dalam pelbagai industri di seluruh dunia tahun 2004 adalah melebihi US\$8 bilion. Sebatian ditiokarbamat yang pertama ditemui kegunaannya dalam bidang pertanian ialah *ziram* (zink N,N-dimetilditiokarbamat) oleh Du Pont pada tahun 1934 dan digunakan sebagai racun kulat. Di samping itu ditiokarbamat juga mempunyai aktiviti antibakteria, antikulat, sitotoksik dan pelbagai lagi.

Dalam bidang perubatan pula ditiokarbamat juga telah digunakan dengan meluas, contohnya zink etilena bis-ditiokarbamat pula digunakan untuk merawat kulit yang dijangkiti kulat (Schubart 1985). Dietilditiokarbamat adalah antidot yang amat berkesan terhadap jangkitan HIV manusia dan terkenal sebagai sebatian antitoksik untuk melindungi agen hepatoksik dan mempunyai aktiviti

antikarsinogenik terhadap karsinogen yang berlainan (Frank *et al.*, 1995).

2. Percobaan

Pada peringkat awal kerja penyelidikan sebatian ditiokarbamat ini, kaedah metatesis telah digunakan iaitu menyediakan ammonium ditiokarbamat dahulu dan ditindakbalaskan dengan garam logam dalam pelarut etanol atau metanol (Baba, 1989). Kaedah metatesis ini tidak dapat dikembangkan kepada beberapa jenis amina tertentu oleh itu kaedah kondensasi (Nomura *et al.*, 1987) pula telah digunakan dengan pengubahsuaian daripada yang asal untuk menyediakan ditiokarbamat seterusnya (Baba *et al.*, 1994). Kaedah kondensasi ini adalah proses *in-situ* dengan garam logam, karbon disulfida dan amina yang berkaitan dilarutkan dalam etanol atau metanol pada suhu rendah ($\sim 4^\circ\text{C}$) yang dikacau untuk beberapa jam untuk mendapatkan hasil yang berbentuk mendakan pepejal.

3. Hasil dan Perbincangan

Sebatian ditiokarbamat daripada pelbagai jenis siri amina telah berjaya disintesis daripada logam kumpulan utama, peralihan dan organostanum. Kesemua sebatian ditiokarbamat yang telah disintesis menunjukkan ketulenanan yang tinggi dengan hasilan dalam lingkungan 40 – 80%. Sebatian ditiokarbamat yang berjaya dihasilkan boleh dikategorikan kepada kumpulan seperti berikut:

- Ditiokarbamat Alkil atau Aril dengan Hidroksialkil (RH, R'OH) – Metiletanol, Eiletanol, Feniletanol, Dietanol, Monoetanol, Isopropiletanol dan Butiletanol.
- Ditiokarbamat Alkil dengan Aril (RH, R'H) - Etilmetil, Etilbutil, Etilfenil, Etilsikloheksil, Metilfenil, Metilsikloheksil, Heksilmetil, Heptilmetil, Benzilisopropil, Diisopropil, Etilisopropil, Sikloheksilisopropil dan *Sek*-butilpropil.

- Ditiokarbamat Organostanum [dimetilstanum(IV), dibutilstanum(IV) dan trifenilstanum(IV)] – *Sek*-butilpropil, Metilsikloheksil, Etilsikloheksil dan Isopropilsikloheksil.
- Ditiokarbamat ligan penderma 2,2'-bipiridil dan 1,10-fenantrolina – Etilmetil, Etilbutil, Etilfenil, Etilsikloheksil, Metilfenil, Metilsikloheksil, Heksilmetil, Heptilmetil, Benzilisopropil, Diisopropil, Etilisopropil, Sikloheksilisopropil dan *Sek*-butilpropil.
- Ditiokarbamat terbitan asid amino - $M[S_2CN(CH_3)(CH_2COOH)]_2$ [M (logam) = Co, Cu, Ni, Pd dan Pt; M (organostanum) = $(CH_3)_2Sn$, $(C_6H_5)_2Sn$ dan $(C_4H_9)_2Sn$]

Pencirian secara spektroskopi inframerah terhadap kesemua sebatian ditiokarbamat menunjukkan terdapat tiga puncak getaran penting yang membuktikan kewujudan sebatian ditiokarbamat, iaitu $\nu(C-N)$, $\nu(C-S)$ dan $\nu(M-S)$. Spektrum inframerah untuk kesemua siri sebatian ditiokarbamat telah menunjukkan kehadiran jalur serapan utama yang mencirikan kumpulan ditiokarbamat, iaitu $\nu(C\equiv N)$ (jalur 'tioreida') pada julat nombor gelombang 1400–1650 cm^{-1} (Jian *et al.*, 1999) dan $\nu(C=S)$ pada julat 950-1050 cm^{-1} (Bernal *et al.*, 2001). Jalur getaran kumpulan $\nu(C\equiv N)$ berada pada kedudukan perantaraan di antara $\nu(C=N)$ dan $\nu(C-N)$, iaitu masing-masing pada 1640-1690 cm^{-1} (Casas *et al.*, 1994) dan 1250-1350 cm^{-1} (Thirumaran *et al.*, 1998). Kedudukan jalur serapan $\nu(C-N)$ ini bergantung kepada penyusunan atom sulfur di sekitar logam pusat, saiz kumpulan pengganti, R dan sifat elektronik kumpulan $-NR^1R^2$ (Sharma *et al.*, 1981). Ini menunjukkan penyahtempatan elektron telah berlaku dalam ikatan C-N menyebabkan ianya mempunyai ciri ikatan gandadua separa (Bradley dan Gitlitz, 1969).

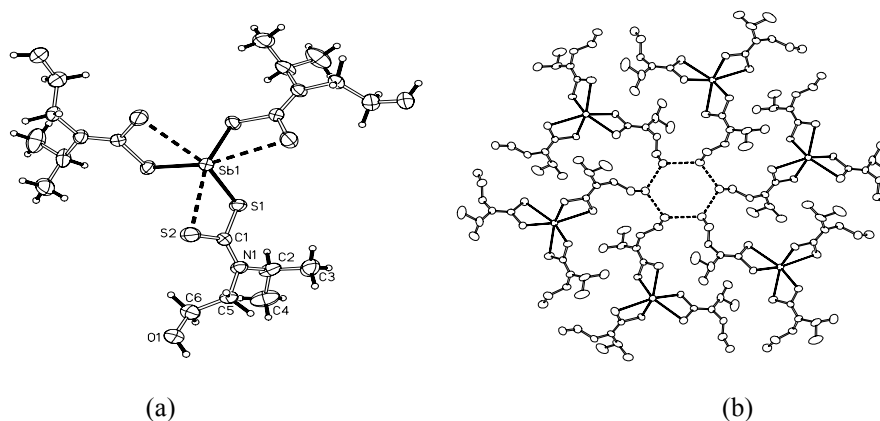
Sebahagian besar sebatian ditiokarbamat yang telah disediakan mempunyai ciri ikatan $C\equiv S$ gandadua separa kerana nombor gelombangnya berada di antara ikatan gandadua $C=S$ (1050-1200 cm^{-1}) dan ikatan tunggal C-S (650-800 cm^{-1}). Ini mencadangkan bahawa pengikatan yang wujud adalah secara isobidentat, iaitu kewujudan bersama mod ikatan monodentat dan bidentat (Sharma *et al.*, 1981). Jalur

serapan $\nu(C-S)$ untuk pengikatan secara monodentat terbelah dua membentuk jalur dublet yang terpisah $\sim 20\text{ cm}^{-1}$ (Bonati dan Ugo, 1967) manakala pengikatan bidentat pula jalur serapan $\nu(C-S)$ dicerap sebagai jalur tunggal (Xu *et al.*, 2001). Jalur getaran yang berada pada kawasan inframerah jauh (400-300 cm^{-1}) dikenalpasti untuk ikatan logam-sulfur, $\nu(M-S)$ (Baba *et al.*, 1995).

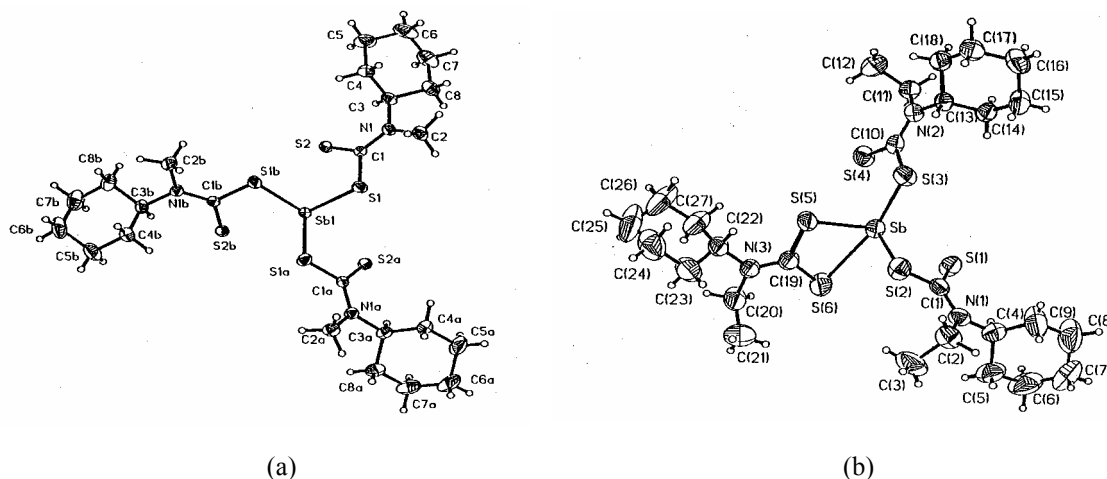
Analisis spektroskopi resonan magnet nukleus (RMN) 1H dan ^{13}C telah dilakukan untuk semua sebatian ditiokarbamat yang larut dan bersifat *diamagnet* menggunakan pelarut kloroform terdeuterat, $CDCl_3$ dan DMSO terdeuterat. Spektrum RMN yang penting dan perlu diambil perhatian adalah anjakan kimia $\delta(N^{13}CS_2)$ pada julat 185-220 ppm untuk kesemua sebatian ditiokarbamat yang telah disediakan (van Gaal *et al.*, 1979). Kesemua sebatian ditiokarbamat telah menunjukkan puncak $N-^{13}C-S$ dalam julat yang dijangkakan bukti penting kewujudan komponen ikatan dalam sebatian ditiokarbamat.

Lebih daripada lima puluh sebatian ditiokarbamat dalam siri kumpulan pengganti alkil atau aril dengan hidroksilalkil daripada logam peralihan atau logam kumpulan utama telah berjaya disintesis. Sebahagiannya telah diperoleh struktur hablur, contohnya struktur sebatian tris(2-hidroksietilisopropilditiokarbamato)stibium(III) yang dilaporkan oleh Low *et al.*, (2001) (Rajah 2a). Hablur tris(2-hidroksietilisopropilditiokarbamato)stibium(III) hemihidrat mengandungi 12 molekul per unit sel dan menunjukkan berstruktur oktahedron terherot dengan kewujudan interaksi ikatan hidrogen disebabkan adanya molekul hidrat (Rajah 2b). Sudut kelat yang kecil pada kumpulan ditiokarbamat menyebabkan pengkelatan pada atom stibium bersifat anisobidentat.

Untuk sebatian ditiokarbamat dengan kumpulan pengganti alkil dan aril pula, lebih daripada tujuh puluh sebatian daripada gabungan kumpulan pengganti alkil dan aril yang berbeza dengan logam peralihan atau logam kumpulan utama telah berjaya disintesis dan sebahagiannya telah diperoleh struktur hablur. Struktur hablur tris(N-metil-N-sikloheksilditiokarbamato)stibium(III) (Rajah 3a) mempunyai sistem hablur *heksagonal*



Rajah 2. Plot *ORTEP* a) tris(2-hidroksietilisopropilditiokarbamato)stibium(III) (pada paras kebarangkalian 50 % elipsoid), b) Interaksi ikatan hidrogen tris(2-hidroksietilisopropilditiokarbamato)stibium(III) hemihidrat.



Rajah 3. Plot *ORTEP* (a) tris(*N*-metil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)stibium(III), (b) tris(*N*-etil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)stibium(III) (paras kebarangkalian 50% elipsoid).

dengan kesemua ikatan logam-sulfur wujud secara monodentat. Ketiga-tiga ikatan logam sulfur, iaitu $Sb(1)-S(1) = 2.5288(5)$, $Sb(1)-S(1a) = 2.5288(5)$ dan $Sb(1)-S(1b) = 2.5304(5)$ Å adalah hampir sama panjang dan sudut ikatan antara $S-Sb-S$ juga hampir sama ($87.10(2)^\circ$, $87.15(2)^\circ$ dan $87.18(2)^\circ$).

Manakala struktur hablur tris(*N*-etil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)stibium(III) (Rajah 3b) yang mempunyai sistem hablur *triklinik* pula menunjukkan bahawa ikatan monodentat dan bidentat boleh wujud dalam satu struktur sebatian yang sama. Jarak atom $Sb-S(1)$ dan $Sb-S(4)$ melampaui jarak yang boleh menunjukkan wujudnya pengikatan jika dibandingkan dengan jarak $Sb-S(2)$, $Sb-S(3)$, $Sb-S(5)$ dan $Sb-S(6)$ masing-masing pada jarak 2.5429(11), 2.5486(10), 2.5605(10) dan 2.8559(12) Å.

Untuk siri sebatian organostanum ditiokarbamat terdapat empat jenis amina, iaitu *N*-sek-butilpropilamina, *N*-metilsikloheksilamina, *N*-etilsikloheksilamina dan *N*-isopropilsikloheksilamina telah bertindak balas dengan tiga jenis sebatian organostanum(IV), iaitu dimetilstanum(IV), dibutilstanum(IV) dan trifenilstanum(IV) klorida. Struktur hablur daripada sebatian organostanum(IV) yang disintesis menunjukkan mod pengkelatan di antara kumpulan organostanum dan ligan bergantung kepada keadaan sterik. Keadaan pengkelatan jenis isobidentat telah berlaku dalam keempat-empat struktur sebatian ditiokarbamat trifenilorganostanum(IV), contohnya sebatian (*N*-metil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)trifenilstanum(IV) (Rajah 4a) menunjukkan ikatan $Sn(1)-S(1) = 2.4558(6)$ Å dan $Sn(1)...S(2) = 3.0134(8)$ Å tak

sama panjang (Awang *et al.*, 2003). Struktur hablur bis(*N*-metil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)dimetilstanum(IV) pula menunjukkan imej cermin dengan satah cerminnya dibentuk oleh atom C(9), Sn(1) dan C(10) (Rajah 4b), sama seperti yang telah dilaporkan untuk sebatian dimetilstanum(IV) dihidroksietilditiokarbamat (Farina *et al.*, 2000).

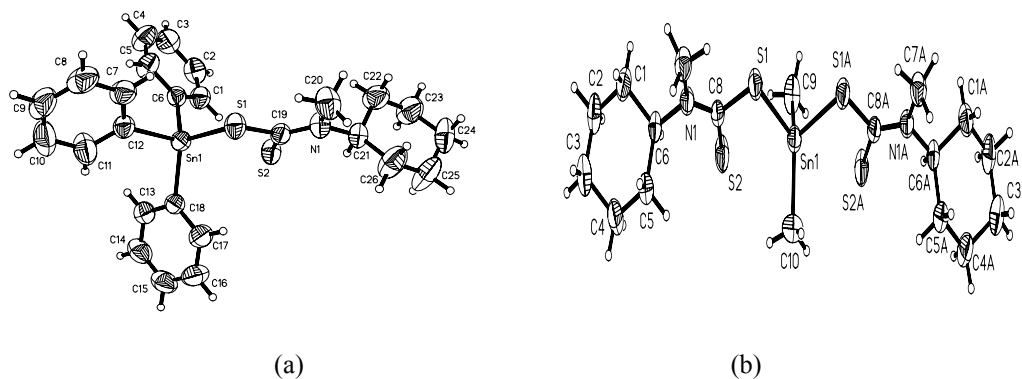
Hanya tiga jenis logam sahaja daripada pelbagai siri sebatian ditiokarbamat telah bertindak balas dengan ligan 2,2'-bipiridil dan 1,10-fenantrolin membentuk aduk dan kesemuanya telah dicirikan dengan langkap. Satu daripada contoh struktur hablur aduk adalah (N-isopropil-*N*-isopropilditiokarbamato)zink(II),2,2-bipiridil, Zn[S₂CN(*i*C₃H₇)(C₂H₅OH)]₂.Bipy (Rajah 5a) adalah molekul monomer yang diskrit dengan sistem hablur *monoklinik* seperti yang dilaporkan terhadap sebatian Zn[S₂CN(*n*-C₄H₉)₂].Bipy oleh Ivanchenko *et al.*, (2000). Struktur Zn[S₂CN(*i*C₃H₇)(C₂H₅OH)]₂.Bipy menunjukkan kedua-dua kumpulan ditiokarbamatnya mengkelat secara bidentat simetri dengan panjang ikatan [Zn(1)–S(1) = 2.5055(7) Å, Zn(1)–S(2) = 2.5385(8) Å; Zn(1)–S(1A) = 2.5055(7) Å, Zn(1)–S(2A) = 2.5385(8) Å]. Ligan 2,2'-bipiridil pula berikat secara simetri dengan kedua-dua panjang ikatan Zn(1)–N(1) dan Zn(1)–N(1A) adalah 2.173(2) Å. Daripada gambaran susunan molekul Zn[S₂CN(*i*C₃H₇)(C₂H₅OH)]₂.Bipy menunjukkan wujudnya ikatan hidrogen di antara atom hidrogen daripada kumpulan OH dengan atom sulfur molekul bersebelahan (O1–H1A...S2 = 3.272(3) Å) pada sudut ikatan

154°.

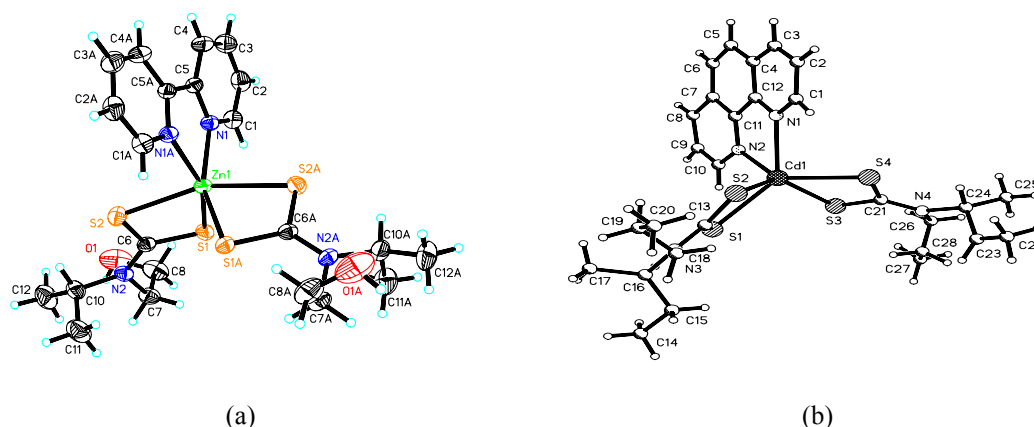
Struktur hablur (N-butyl-*N*-etanolditiokarbamato)kadmium(II),1,10-fenantrolin, Cd[S₂CN(C₄H₉)(C₂H₅OH)]₂.Phen (Rajah 5b) wujud sebagai molekul monomer dengan sistem hablur *monoklinik*. Atom kadmium berkoordinat enam secara bidentat tidak simetri dengan kedua-dua kumpulan ditiokarbamat dengan Cd(1)–S(1) = 2.6376(9) Å dan Cd(1)–S(2) = 2.6940(10) Å; Cd(1)–S(3) = 2.6376(9) Å dan Cd(1)–S(4) = 2.6940(10) Å. Panjang ikatan adalah hampir sama dengan sebatian aduk Cd[S₂CN(C₂H₅)₂].Phen yang telah dilaporkan oleh Glinskaya *et al.*, (1992). Manakala pengkoordinatan atom pusat kadmium dengan ligan 1,10-fenantrolin adalah secara bidentat simetri tepat dengan jarak ikatan Cd(1)–N(1) dan Cd(1)–N(2) = 2.396(3) Å.

4. Ujian Aplikasi

Ujian Antimikrob. Sebahagian sebatian ditiokarbamat telah diuji terhadap aktiviti antimikrob kecuali sebatian raksa. Ujian ini dihadkan kepada penggunaan dua bakteria, iaitu *S. aureus* SKUK 73 dan *S. typhi* SKUK 60 dengan menggunakan kawalan positif tetrasiklin (2.0 cm) kerana bakteria lain kurang memberi kesan terhadap sebatian ditiokarbamat yang diuji. Hasil daripada ujian ini sebahagian daripada sebatian tersebut telah menunjukkan aktiviti yang positif terhadap dua bakteria ini. Hasil ujian ini menunjukkan bahawa sebahagian daripada sebatian ditiokarbamat menunjukkan interaksi positif sebagai antimikrob kepada dua jenis bakteria *S. aureus* SKUK 73 dan *S. typhi* SKUK 60 pada kepekatan 10 mg/mL. Sebagai contohnya,



Rajah 4. Plot ORTEP a) (*N*-metil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)trifenilstanum(IV), b) bis(*N*-etil-*N*-sikloheksilditiokarbamato)dibutilstanum(IV) (pada paras kebarangkalian 50% elipsoid).



Rajah 5. Plot struktur sebatian a) $Zn[S_2CN(iC_3H_7)(C_2H_5OH)]_2 \cdot Bipy$ dan b) $Cd[S_2CN(C_4H_9)(C_2H_5OH)]_2 \cdot Phen$ (pada paras kebarangkalian 50% elipsoid).

zink(II) metiletanolditiokarbamat (2.1 cm) atau stibium(III) dietanolditiokarbamat (3.4 cm) terhadap bakteria *S. aureus* SKUK 73 dan kadmium(II) dietanolditiokarbamat (1.6 cm) terhadap bakteria *S. typhi* SKUK 60.

Ujian Sitotoksik. Hampir kesemua sebatian ditiokarbamat yang mudah larut telah dilakukan ujian awal sitotoksik. Ujian penyaringan aktiviti sitotoksik terhadap sel leukemia manusia jenis “*promyelocytic*” (HL-60) telah dijalankan terhadap beberapa sebatian ditiokarbamat pilihan. Penunjuk aktiviti sitotoksik berdasarkan kepada nilai CD_{50} , iaitu kepekatan sebatian yang diperlukan untuk mengurangkan pertumbuhan sel kanser pada paras 50%.

Hasil kajian untuk beberapa sebatian organostanum ditiokarbamat, contohnya trifenilstanum(IV) ditiokarbamat menunjukkan aktiviti sitotoksik yang lebih baik jika dibandingkan sebatian dibutilstanum(IV). Kesemua sebatian dibutilstanum(IV) dan trifenilstanum(IV) dikategorikan sebagai sebatian yang mempunyai keaktifan yang tinggi terhadap sel leukemia HL-60 kerana nilai CD_{50} nya adalah $< 5.0 \mu g/mL$ ($0.17 - 0.92 \mu g/mL$). Ini bersesuaian dengan kajian yang dilakukan oleh Crowe (1987) melaporkan kebanyakan sebatian organostanum terutamanya sebatian triorganostanum telah menunjukkan ciri-ciri sitotoksik yang kuat terhadap beberapa sel tumor.

Ujian Antioksidasi. Sebatian ditiokarbamat daripada logam zink sahaja telah dipilih untuk ujian ini kerana kajian terdahulu menunjukkan

ianya mempunyai kereaktifan yang tinggi terhadap bahan polimer sebagai antioksidasi jika dibandingkan dengan logam lain. Contohnya, empat sebatian ditiokarbamat yang dipilih adalah zink(II) etilbutil-, sikloheksilisopropil-, etilisopropil- dan isopropiletanolditiokarbamat serta antioksidasi komersial yang dibekalkan dicampurkan dalam formulasi adunan NR:LLDPE (Getah asli: Polietilena linear berketumpatan rendah) pada kepekatan (% berat) yang berlainan. Formulasi ini dibandingkan dengan formulasi tanpa antioksidasi (kawalan) yang digunakan untuk mengkaji kesan pelbagai antioksidasi pada kepekatan berlainan ke atas sifat mekanikal bagi adunan NR-LLDPE sebelum dan selepas penuaan ketuhar.

Ujian menunjukkan kesemua sebatian ditiokarbamat yang diuji dapat melindungi adunan NR:LLDPE terhadap penuaan haba. Sebagai contohnya, adunan yang mengandungi zink(II) etilisopropilditiokarbamat dan zink(II) isopropiletanolditiokarbamat boleh mengekalkan kekuatan tegangan masing-masing sebanyak 54, 55, 55 dan 59% berbanding dengan adunan tanpa antioksidasi (kawalan) yang hanya dapat mengekalkan kekuatan tegangan sebanyak 32% sahaja selepas penuaan selama 8 hari dalam ketuhar. Nilai ini menunjukkan bahawa sampel polimer yang mengandungi sebatian ditiokarbamat mempunyai jangka hayat yang lebih panjang jika dibandingkan dengan antioksidasi komersial.

2% Zink(II) sikloisopropilditiokarbamat $>$ 1% Zink(II) etilbutiditiokarbamat $>$ 1% Zink(II) sikloheksilisopropilditiokarbamat $>$ 2% WSP $>$

2% Zink(II) etilbutilditiokarbamat > 2% Irganox 1010 > 1% WSP > 2% Zink(II) isopropiletanolditiokarbamat > 2% Zink(II) etilisopropilditiokarbamat > 1% Zink(II) isopropiletanolditiokarbamat > 1% Zink(II) etilisopropilditiokarbamat > 1% Irganox 1010 > Kawalan

5. Kesimpulan

Hampir dua ratus sebatian ditiokarbamat serta aduknya dengan ligan 2,2'-bipiridil dan 1,10-fenantrolin daripada pelbagai logam, organostanum dan gabungan amina telah berjaya disintesis dan dicirikan dengan lengkap dan sebahagian daripadanya telah berjaya diperolehi strukturnya dengan menggunakan kaedah hablur tunggal sinar X. Beberapa pendekatan dan pengubahsuaian kaedah sintesis baru telah digunakan dalam sintesis bagi mendapatkan hasilan ditiokarbamat yang optimum.

Ujian penyaringan aplikasi untuk aktiviti antimikrob menunjukkan sebahagian daripada sebatian ditiokarbamat menunjukkan aktiviti yang sangat baik terhadap bakteria tertentu dengan diameter zon pencatan > 15 mm. Ujian penyaringan aktiviti sitotoksik terhadap beberapa sebatian ditiokarbamat menunjukkan sebahagiannya dikategorikan sebagai sangat aktif terhadap sel leukemia HL-60 dengan nilai $CD_{50} < 5.0 \mu\text{g/mL}$. Manakala ujian sifat antioksidasi untuk beberapa sebatian ditiokarbamat terpilih menunjukkan ada potensi sebagai bahan antipengoksida dalam melindungi termoplastik getah asli yang diadun daripada degradasi jangka panjang oleh haba dan oksigen.

Berdasarkan ujian awal ujian aktiviti biologi dan antioksidasi menunjukkan terdapat beberapa sebatian ditiokarbamat yang menunjukkan potensi yang positif sebagai agen antimikrob, antikanser dan antioksidasi. Namun begitu ujian lanjut harus dilakukan terhadap sebatian tersebut untuk memastikan keberkesanannya.

6. Penghargaan

Setinggi penghargaan diberikan kepada Kerajaan Malaysia melalui MOSTE untuk gran IRPA - IRPA 02-07-03-017, 09-02-02-0010, IRPA 09-02-02-0096 dan 09-02-02-0048-EA144. Kepada pelajar siswazah Normah Awang, Kamariah Muda, Sukeria Ibrahim, Lai Fook Chuan, Low Kean Yong, Karimah Kassim, Yong Soon Kong dan Indah Raya

kerana kerja sintesis, pencirian dan ujian aplikasi. Kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana memberikan ruang dan peralatan untuk menjayakan projek ini. Akhir sekali kepada Prof. Bohari Mohd Yamin (UKM), Prof. H.K. Fun (USM), Prof. M. G. B. Drew (University of Reading, UK) dan Prof. Allan H. White (UWA, Australia) untuk penyelesaian struktur hablur. Prof. Manaf Ali (UPM), Prof. Ismail Ahmad (UKM) dan Prof. Rahmah Mohamkadmium(II) ad (UKM) kerana membantu dalam ujian aplikasi biologi.

7. Daftar Pustaka

- Awang, N., Baba, I., Yusof, M.S.M. & Yamin, B.M. (2003). (N-cyclohexyl-N-methyldithiocarbamato)triphenyltin(IV). *Acta Cryst. E59*: m414-m415.
- Baba, I. (1989). Kajian terma sebatian dietanolditiokarbamat untuk logam Ti(IV), Fe(III), Cr(III), Co(III) dan Mn(II). *Laporan Teknik FSFG* 3: 147-152.
- Baba, I., Awang, N., Farina, Y. & Abdullah, J. (1994). Synthesis and Characterization of Methylethanoldithiocarbamate Complexes of Zn(II), Cd(II) and Hg(II). *Bull. Kimia* 9(2): 117-121.
- Baba, I., Awang N. & Farina, Y. (1995). Kompleks zink dietanol- dan metiletanolditiokarbamat. *Sains Malaysiana* 24(2): 17-22.
- Bernal, C., Neves, E.A. & Cavalheiro, T.G. (2001). Differences in thermal decomposition of Ag(I), Mn(II), Fe(II) and Fe(III) complexes of cyclix dithiocarbamates. *Thermochimica Acta* 370(1-2): 49-55.
- Bonati, F. & Ugo, R. (1967). Organotin(IV) N,N-disubstituted dithiocarbamates. *J. Organomet. Chem.* 10: 257-268.
- Bradley, D.C. & Gitlitz, M.H. (1969). Preparation and properties of N,N-dialyldithiocarbamates of early transition elements. *J. Chem. Soc. (A)*: 1152-1156.
- Casas, J.S., Castaño, M.V., Freire, C., Sánchez, A. Sordo, J., Castellano, E.E. & Zukerman-Schpector, J. (1994). Dithiocarbamates of dimethylthallium(III). Crystal structure of dimethyl(di-n-propyldithiocarbamato)thallium(III). *Inorg. Chim. Acta* 216: 15-20.
- Crowe, A.J. (1987). The chemotherapeutic properties of tin compounds. *Drug Future* 12: 55-275.
- Farina, Y., Othman, A.H., Baba, I., Sivakumar, K., Fun, H.K. & Ng, S.W. (2000). Bis(N,N-bisdihydroxyethylthiocarbamato)dimethyltin(IV). *Acta Cryst. E56*: e84-e85.

- Frank, N., Christmann, A. & Frei, E. (1995). Comparative studies on the pharmacokinetics of hydrophilic prolinedithiocarbamate, sarcosinedithiocarbamate and the less hydrophilic diethyldithiocarbamate. *Toxicology* 95: 113-122.
- Glinskaya, L.A., Klevtsova, R.F. & Zemskova, S.M. (1992). Crystal and molecular structures of volatile complexes formed by bis(diethyldithiocarbamate)cadmium with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridyl. *J. Struct. Chem.* **33(1)**: 106-114.
- Ivanchenko, A.V., Gromilov, S.A., Zemskova, S.M. & Baidina, I.A. (2000). Investigation of complexes of zinc(II) and cadmium(II) di-*n*-butyldithiocarbamate with 2,2'-bipyridyl. *J. Struct. Chem.* **41(1)**: 88-95.
- Jian, F.F., Wang, Z.X., Bai, Z.P., You, X.Z., Fun, H.K. & Chinnakali, K. (1999). Structure of bis(dipropyldithiocarbamate) cadmium(II), [Cd₂(*n*-Pr₂dte)₄] (dte = dithiocarbamate). *J. Chem. Crystallogr.* 29(2): 227-231.
- Low, K.Y., Baba, I., Farina, Y., Othman, A.H., Ibrahim, A.R. & Fun, H.K. (2001). Crystal structures of tris(2-hydroxyethylisopropyldithiocarbamate)antimony and tris(2-hydroxyethylisopropyldithiocarbamate)bismuth hemihydrates. *Main Group Metal Chem.* **24(7)**: 451-452.
- Nomura, R., Takabe, A. & Matsuda, H. (1987). Facile synthesis of antimony dithiocarbamate complexes. *Polyhedron* **6(3)**: 411-416.
- Okamoto, K., Kirchoff, J.R., Ho, D.M. and Deutsch, E. (1993). Preparation, characterization and electrochemical properties of technetium(II) complexes with 1, 2-bis(diethylphosphino) ethane (DEPE) and dithiocarbamate ligands. Single crystal analysis of [Tc{(CH₃)₂NCS₂}(DEPE)₂(PF₆)]. *Polyhedron* **12(12)**: 1559-1568.
- Radha, K., Aravamudan, G., Rajalakshmi, A., Rout, G.C. and Seshasayee M., (1986). Synthesis and properties of tris(bis(2-hydroxyethyl)-dithiocarbamate)halotellurium(II) ('halo'=SCN⁻, Br⁻, I⁻) and the crystal structure of the thiosyanato-S complex, [Te₂{(HOCH₂CH₂)₂NCS₂}₃SCN]. *Aust. J. Chem. Soc.* 39: 847-854.
- Schubart, R. (1985). Dithiocarbamic acid and derivatives. Bayer AG, Leverkusen, Federal Republic of Germany. *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry* A9: 1-27.
- Sharma, C.P., Kumar, N., Khandpal, M. C., Chandra, S. & Bhide, V.G. (1981). Studies on the preparation and characterisation of bis-dithiocarbamate derivatives of di-*n*-butyl- and di-*n*-hexyl Sn(IV). *J. Inorg. Nucl. Chem.* **43**: 923-930.
- Thirumaran, S., Venkatachalam, V., Manohar, A., Ramalingam, K., Bocelli, G. & Cantoni, A. (1998). Synthesis and characterization of bis(N-methyl-N-ethanol-dithiocarbamate)M(II) (M = Zn, Cd, Hg) complexes and bis(N,N-(iminodiethylene)bisphthalimidedithiocarbamate)M(II) (M = Zn, Cd, Hg) complexes. Single crystal X-ray structure of bis(di(2-hydroxyethyl)-dithiocarbamate)zinc(II). *J. Coord. Chem.* **44**: 281-288.
- Thorn, G.D. & Ludwig, R.A. (1962). *The dithiocarbamates and related compounds*. Amsterdam-New York: Elsevier Publishing Company.
- Van Gaal, H.L.M., Diesveld, J.W., Pijpers, F.W. & Vander Linden, J.G.M. (1979). ¹³C NMR spectra of dithiocarbamates. Chemical shifts, carbon-nitrogen stretching vibration frequencies, and π bonding in the NCS₂ fragment. *Inorg. Chem.* **18(11)**: 3251-3260.
- Xu, L.Z., Zhao, P.S. & Zhang, S.S. (2001). Crystal structure and characterization of Pd(II) bis(diisopropyldithiocarbamate) complex. *Chinese J. Chem.* **19(4)**: 436-440.



Elektroda Pasta Karbon yang Dimodifikasi dengan Xilenol Oranye untuk Analisis Timbal

Indra Noviandri¹⁾, Francisca N. Liman¹⁾

¹⁾ Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha No 10 Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: innov@chem.itb.ac.id

Abstract

Pada penelitian ini elektroda pasta karbon yang dimodifikasi dengan xilenol oranye (XO) telah dikembangkan untuk analisis ion Pb²⁺ di dalam beberapa matriks air. Xilenol oranye menunjukkan kemampuan untuk mengakumulasi ion Pb²⁺ lebih banyak di permukaan elektroda sehingga pengukuran menjadi lebih sensitif. Elektroda ini memiliki daerah linier hingga konsentrasi ion Pb²⁺ terendah 1 ppb. Kebolehulangan pengukuran elektroda sangat baik dengan standar deviasi pengukuran 6,5%. Analisis spike sampel dalam matriks air laut, air sungai dan air mineral menunjukkan bahwa elektroda ini memberikan akurasi pengukuran yang sangat baik dengan persen perolehan kembali berkisar antara 97 – 103 % pada daerah konsentrasi ion Pb²⁺ antara 0,01 – 10 ppm. Akurasi pengukuran sedikit berkurang pada konsentrasi yang lebih rendah.

Paper is on page 1065

Analisis Struktur Hasil Kopolimerisasi dari Monomer β -Butirolakton dan δ -Valerolakton dengan Katalisis Aluminoksan

I. M. Arcana, B. Tanajaya, B. Anwar, C.L. Radiman, dan M.A. Sulfikar

Laboratorium Kimia Fisik Material, Departemen Kimia – Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha No. 10, Bandung 40132, INDONESIA
E-mail : arcana@chem.itb.ac.id

Abstrak

Poli(hidroksibutirat-co-valerolakton) $P(\text{HB-co-VL})$ telah disintesis secara kimia melalui kopolimerisasi pembukaan cincin monomer (R,S)- β -butirolakton rasemik dengan δ -valerolakton pada berbagai komposisi monomer dengan menggunakan tetraisobutildialuminoksan sebagai katalis. Pada makalah ini dilaporkan studi lebih lanjut mengenai struktur kopolimer berdasarkan analisis distribusi sekuen diad kopolimer melalui penentuan intensitas puncak resonansi gugus karbonil (RMN^{13}C). Dari analisis faktor kereaktifan monomer terhadap katalis yang digunakan telah ditunjukkan bahwa kereaktifan monomer δ -valerolakton (δ -VL) lebih tinggi dibandingkan kereaktifan monomer β -butirolakton (β -BL) ($r_{\text{VL}} = 7,89$, dan $r_{\text{BL}} = 0,65$). Dari hasil tersebut telah diperkirakan bahwa kopolimer hasil sintesis tersusun dari campuran homopolimer PVL dan PHB dengan sekuen PVL lebih panjang dari sekuen PHB. Dari analisis distribusi sekuen diad kopolimer diusulkan bahwa kopolimer hasil sintesis tersusun dari kopolimer blok dengan ukuran blok bervariasi. Berdasarkan analisis sifat termalnya, kopolimer memiliki temperatur transisi glass tunggal yang berada diantara temperatur transisi glass homopolimer murninya. Hasil ini dapat mendukung hasil analisis faktor kereaktifan monomer dan distribusi sekuen diad kopolimer bahwa kopolimer hasil sintesis merupakan campuran polimer kompatibel.

Kata Kunci : Sintesis, kopolimer, aluminoksan, butirolakton, valerolakton

1. Pendahuluan

Sintesis secara kimia suatu polimer, khususnya pada sintesis homopolimer dan kopolimer yang melibatkan hidroksibutirat sebagai unit ulangnya (konstitusionalnya) telah banyak diteliti oleh beberapa grup penelitian. Beberapa hasil penelitian tersebut telah memperlihatkan bahwa kemampuan polimerisasi dari monomer-monomer heterosiklik dipengaruhi oleh besar kecilnya ukuran cincin, ada tidaknya grup heterofungsional, jenis dan sistem katalis yang digunakan serta kondisi reaksi (Doi et al., 1990 dan Kunioka et al., 1990).

Monomer β -BL dan lakton non-substitusi seperti ϵ -caprolakton dan δ -valerolakton telah juga dikembangkan dalam *living-polymerization* dengan tujuan mensintesis kopolimer blok yang dapat memiliki sifat-sifat

dan karakteristik tertentu (Kricheldorf et al., 1994 dan Dubois et al., 1993).

Billingham dkk telah melaporkan kopolimerisasi (R,S)- β -BL dengan jenis lakton lain seperti ϵ -caprolakton (ϵ -CL) menggunakan katalis $\text{ZnAl}_2\text{O}_2(\text{OCHCH}_3)_4$ (Billingham et al., 1988, 1989). Hasilnya menunjukkan bahwa kereaktifan lakton substitusi dengan lakton non-substitusi sangat berbeda. Hasil yang sama terjadi juga pada kopolimerisasi dengan menggunakan katalis organoaluminium ($\text{AlEt}_3/\text{H}_2\text{O}$). Kopolimer tersebut telah ditemukan memiliki distribusi sekuen rantai acak dari unit monomer BL dan CL (Bloembergen et al., 1987).

Dalam penelitian sebelumnya telah dilaporkan hasil mengenai polimerisasi pembukaan cincin

monomer (R,S)- β -BL rasemik untuk menghasilkan poli-(R,S)- β -hidroksibutirat dan kopolimernya dengan monomer lakton non-substitusi seperti δ -VL menggunakan katalis tetraisobutil-dialuminoksan. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa katalis tetraisobutil-dialuminoksan menghasilkan polimer stereo-reguler sebagian yang bergantung pada sistem katalis yang digunakan dan perlakuan polimer melalui ekstraksi pelarut (Arcana, 1999). Pada pembentukan kopolimer terjadi peningkatan komposisi komonomer VL dalam kopolimer dan sebaliknya komposisi komonomer BL mengalami sedikit penurunan dibandingkan dengan komposisi awal monomer. Berat molekul kopolimer P(HB-co-VL) maksimum terjadi pada kopolimer dengan komposisi monomer BL sebesar 10 %. Hal ini dapat disebabkan karena disamping berat molekul monomer δ -VL lebih tinggi dibandingkan berat molekul monomer (R,S)- β -BL, juga diperkirakan karena monomer β -BL lebih sukar terpolimerisasi akibat adanya halangan sterik dimana dalam cincinnya terdapat gugus CH_3 (Arcana et al., 2004). Hasil pengamatan ini terdapat kesesuaian dengan hasil yang diperoleh dari penelitian Billingham dkk. Pada studi sebelumnya berdasarkan analisis faktor kereaktifan monomer menunjukkan bahwa kedua pusat aktif perpanjangan rantainya ($-\text{VL}^*$ dan $-\text{BL}^*$) dalam kopolimerisasi lebih cenderung mengikat monomer δ -VL dibandingkan monomer β -BL, sehingga cenderung terbentuk homo-polimer PVL dan PHB atau kopolimer blok dengan panjang sekuen blok bervariasi. Begitu pula berdasarkan analisis termal dengan DSC telah ditunjukkan bahwa kopolimer memiliki temperatur transisi glas bervariasi sesuai dengan komposisi komonomernya, dimana makin tinggi komposisi VL dalam kopolimer temperatur transisi glasnya semakin menurun (Arcana et al., 2004)

Pada makalah ini akan disampaikan hasil studi lebih lanjut mengenai struktur kopolimer hasil kopolimerisasi pembukaan cincin antara monomer (R,S)- β -BL rasemik dengan δ -VL pada berbagai komposisi awal monomer dengan menggunakan katalis tetraisobutil-dialuminoksan.

2. Experimental

Sintesis dan Pemurnian Polimer

Monomer (R,S)- β -BL rasemik, δ -VL, dan bahan katalis organotin diperoleh dari Aldrich Chemical Co. Monomer (R,S)- β -BL, δ -VL dikeringkan dengan CaH_2 dan didestilasi secara fraksinasi masing-masing pada $70^\circ\text{C}/30$ mmHg dan $65^\circ\text{C}/10$ mmHg. Katalis (TIBAO 30 % dalam sikloheksana) dimasukkan ke dalam reaktor polimerisasi, kemudian sikloheksananya diuapkan. Reaktor polimerisasi didinginkan pada -78°C , kemudian monomer lakton dengan komposisi tertentu dimasukkan ke dalam reaktor. Setelah reaktor ditutup (*sealed*) dalam kondisi vakum, dilakukan reaksi polimerisasi pada suhu 60°C selama 7 hari. Setelah reaktor polimerisasi dibuka, eter ditambahkan ke dalam polimer (100 mL/g monomer) sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Padatan polimer dipisahkan, kemudian ditambah kloroform (100 mL/g monomer). Campuran polimer diaduk selama 12 jam pada suhu kamar dan direfluk selama $\frac{1}{2}$ jam. Larutan jernih dalam kloroform dipekatkan menjadi 10 mL/g monomer. Larutan terakhir dipresipitasi dalam eter, kemudian polimer yang diperoleh dikeringkan pada suhu kamar dalam suasana vakum.

Karakterisasi Polimer

Entalpi pelelehan (ΔH_m), temperatur pelelehan (T_m), dan temperatur transisi gelas (T_g) untuk semua sampel polimer ditentukan dengan menggunakan *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. Sampel kira-kira 5 mg dalam tempat aluminium dipanaskan dengan laju pemanasan $10^\circ\text{C}/\text{menit}$ dari -100°C sampai 200°C . Pada pengukuran dengan RMN^1H 400 MHz dan RMN^{13}C 250 MHz, spektrogram polimer dicatat pada $25-30^\circ\text{C}$ dengan pelarut CDCl_3 dan tetrametilsilan digunakan sebagai standar

3. Hasil dan Pembahasan

Sintesis secara kimia melalui kopolimerisasi pembukaan cincin monomer (R,S)- β -BL dan δ -VL telah dilakukan pada kondisi optimal yang sama dengan kondisi optimal homopolimerisasi (R,S)- β -BL pada sintesis P(R,S)- β -HB (Arcana, 1999).

Spektroskopi RMN^1H telah digunakan untuk menentukan komposisi komonomer dalam kopolimer lewat integrasi puncak / intensitas hidrogen methin (CH) untuk unit BL dan

hidrogen methilen (CH_2) untuk unit VL (Gb.2). Hasil-hasil tersebut menunjukkan bahwa komposisi komonomer dalam kopolimer hampir identik dengan komposisi awal monomer (Tabel 1). Pada studi sebelumnya berdasarkan analisis faktor kereaktifan monomer yang dihitung dari data komposisi awal monomer (f_B) dan data komposisi komonomer dalam kopolimer (F_B) berdasarkan metode Fineman-Ross diperoleh besarnya faktor kereaktifan masing-masing monomer dalam kopolimer P(HB-co-VL) adalah $r_{BL} = 0,65$ dan $r_{VL} = 7,89$ (Arcana et al., 2004). Hasil ini menunjukkan bahwa kedua pusat aktif perpanjangan rantainya ($-\text{VL}^*$ dan $-\text{BL}^*$) dalam kopolimerisasi lebih cenderung mengikat monomer δ -VL dibandingkan monomer β -BL, sehingga cenderung terbentuk homo-polimer PVL dan PHB atau kopolimer blok dengan panjang sekuen blok bervariasi.

Berdasarkan analisis termal dengan DSC telah ditunjukkan bahwa kopolimer memiliki temperatur transisi glas bervariasi dari 2°C sampai -62°C sesuai dengan komposisi komonomernya, dimana makin tinggi komposisi VL dalam kopolimer temperatur transisi glasnya semakin menurun. Dari analisis tersebut telah diperlihatkan adanya satu temperatur transisi glass yang berada diantara temperatur transisi glass dari PVL dan PHB (Gb.3), dan temperatur transisi glass hasil perhitungan menurut persamaan Fox dan Cauchman-Karasz ternyata terdapat kesesuaian dengan temperatur transisi glass yang diperoleh langsung lewat termogram DSC (Arcana et al., 2004).

Pada makalah ini akan disampaikan hasil studi lebih lanjut mengenai struktur kopolimer berdasarkan distribusi *sekuen diad* kopolimer dengan analisis RMN ^{13}C yang memungkinkan akan lebih jelas memperkirakan struktur kopolimer sebenarnya.

Untuk menentukan distribusi komonomer dalam kopolimer P(HB-co-VL) digunakan spektroskopi RMN ^{13}C . Studi ini sangat menarik untuk mengetahui struktur kopolimer hasil sintesis, apakah kopolimer tersebut merupakan kopolimer selang-seling (*alternating copolymer*), kopolimer statistik atau kopolimer blok. Akan tetapi spektra RMN ^{13}C untuk kopolimer tersebut cukup kompleks karena disamping adanya pengaruh

komonomer dari masing-masing unit (BL dan VL), juga terdapat pengaruh taktisitas dari unit BL sendiri.

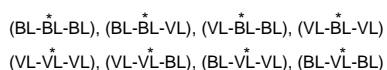
Spektra RMN ^{13}C pada 50,3 MHz untuk kopolimer P(HB48-co-VL52) dapat dilihat pada Gb.4a. Dalam analisis ini, daerah puncak resonansi yang khusus diperhatikan adalah puncak resonansi karbon karbonil disekitar 169,19–173,18 ppm (Gb.4b). Dalam daerah tersebut terlihat dua puncak resonansi tambahan pada 170,13 dan 172,25 ppm disamping puncak resonansi karbon karbonil yang berhubungan dengan homopolimer PHB dan PVL yang masing-masing terletak pada 169,19 ppm dan 173,18 ppm. Adanya dua puncak resonansi tambahan dapat disebabkan oleh adanya pengaruh diad sekuensial akibat lingkungan karbon karbonil dalam rantai polimer berbeda. Jadi 4 sekuen diad komonomer dapat terdeteksi dimana dua puncak resonansi berhubungan dengan karbon karbonil dari unit BL : [BL-BL] dan [BL-VL] dan dua lainnya berhubungan dengan karbon karbonil dari unit VL : [VL-VL] dan [VL-BL].

Sekuen diad komonomer [BL-BL] dan [VL-VL] masing-masing terdistribusi pada puncak resonansi untuk homopolimer PHB pada 169,19 ppm dan untuk PVL pada 173,18 ppm. Jadi secara logika puncak resonansi untuk sekuen diad komonomer [BL-VL] pada 170,13 ppm terletak dekat dengan puncak resonansi sekuen diad [BL-BL] yakni pada 169,19 ppm. Dengan cara yang sama, maka puncak resonansi pada 172,25 ppm dapat dihubungkan untuk sekuen diad komonomer [VL-BL].

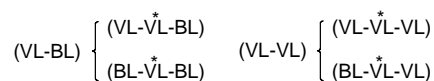
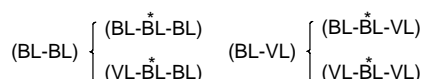
Perluasan puncak resonansi karbon karbonil untuk BL (Gb. 4b) memperlihatkan tiga puncak utama untuk diad komonomer [BL-BL] dan dua puncak untuk diad [BL-VL]. Adanya puncak-puncak resonansi tersebut mungkin dapat dihubungkan karena adanya pengaruh taktisitas dari unit BL. Puncak pada 169,15 ppm untuk diad [BL-BL] ditandai sebagai puncak resonansi sekuen diad isotaktik yakni dengan cara membandingkannya dengan puncak resonansi karbon karbonil dari homopolimer PHB sintetik, dan puncak pada 169,25 ppm ditandai sebagai puncak resonansi sekuen diad sindiotaktik. Dari integrasi puncak resonansi tersebut diperoleh fraksi diad isotaktik sebesar 50 %. Nilai tersebut identik

dengan fraksi diad isotaktik untuk homopolimer PHB yang cenderung ataktik sebagai hasil sintesis pada kondisi yang sama (Bloembergen et al., 1987).

Puncak resonansi karbon karbonil untuk PHB terpisah dalam bentuk doublet pada 169,15 dan 169,25 ppm, sementara puncak resonansi karbon karbonil untuk unit BL dalam kopolimer P(HB-co-VL) terpisah dalam bentuk triplet (puncak tambahan pada 169,38 ppm). Sedangkan puncak resonansi karbon karbonil untuk unit VL pada 172,25 dan 173,18 juga terpisah menjadi beberapa puncak, padahal pengaruh taktisitas tidak ada pada karbon karbonil untuk unit VL. Untuk itu dapat diusulkan bahwa multiplisitas puncak tersebut mungkin dapat disebabkan karena pengaruh sekuensial triad. Akan tetapi resolusi spektrogram RMN tersebut tidak cukup tinggi untuk dapat menandai puncak resonansi dari delapan sekuen triad yang mungkin, dimana empat sekuen triad diberikan untuk pusat sentral BL dan empat lainnya untuk pusat sentral VL. Jika dipertimbangkan karbon karbonil dari unit sentral BL dan VL, maka delapan sekuen triad dapat dituliskan sebagai berikut :



Perlu diperhatikan bahwa lingkungan α dan β karbon karbonil untuk unit sentral BL adalah identik untuk masing-masing dua sekuen triad (BL-BL-BL) dan (VL-BL-BL) dan dua sekuen triad (BL-BL-VL) dan (VL-BL-VL). Dengan cara yang sama untuk unit sentral VL. Kemudian diasumsikan bahwa pergeseran kimia karbon karbonil dalam unit sentral dari sekuen triad (BL-BL-BL) dan (VL-BL-BL) adalah identik atau sangat berimpit. Dari hipotesis ini, maka dapat ditentukan bahwa sekuen diad (BL-BL) mencakup dua sekuen triad (BL-BL-BL) dan (VL-BL-BL). Dengan cara yang sama diperoleh sekuen diad lainnya sebagai berikut:



Pengaruh sekuensial karbon metil, metilen, dan metin untuk unit BL dalam kopolimer tidak terdeteksi kemungkinan terhalangi oleh pengaruh taktisitas. Akan tetapi perluasan puncak resonansi karbon metilen untuk unit VL memperlihatkan dua puncak untuk setiap signal. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh pengaruh sekuen diad komonomer. Dua puncak tersebut jelas terlihat untuk karbon metilen $CH_2(1)$ dan $CH_2(5)$. Dengan cara identifikasi signal karbon dalam spectra homopolimer PVL, maka puncak yang terletak pada medan lebih tinggi diberikan untuk diad sekuen (VL-VL) dan puncak pada medan lebih rendah diberikan untuk sekuen diad (BL-VL) untuk karbon $CH_2(1)$ dan untuk sekuen diad (VL-BL) untuk karbon $CH_2(5)$. Jika model paling sederhana diaplikasikan untuk distribusi sekuen diad, dan proses statistik Bernoullian terjadi pada kopolimerisasi BL/VL, maka fraksi diad ; (BL-BL), (BL-VL), (VL-BL), dan (VL-VL) dapat dihitung dari fraksi mol komonomer BL dalam kopolimer (F_{BL}) sesuai dengan persamaan berikut (Randall, 1977)

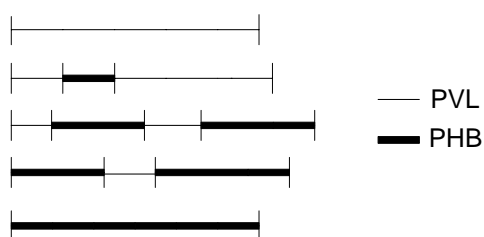
$$(BL-BL) = F_{BL}^2 \quad (1)$$

$$(VL-BL) = (BL-VL) = F_{BL} (1-F_{BL}) \quad (2)$$

$$(VL-VL) = (1-F_{BL})^2 \quad (3)$$

Tabel 3 memperlihatkan nilai fraksi sekuen diad komonomer hasil perhitungan dan hasil observasi langsung dari pengukuran puncak resonansi karbon karbonil spektrogram RMN ^{13}C untuk kopolimer P(HB-co-VL) yang disintesis dengan katalis distanoksan. Secara umum terdapat kesesuaian antara fraksi diad hasil perhitungan dengan fraksi diad hasil observasi langsung dari puncak resonansi karbon karbonil pada 169,2 ppm - 173,2 ppm. Akan tetapi fraksi sekuen diad (BL-BL) hasil observasi sedikit lebih besar dibanding fraksi sekuen diad hasil perhitungan, sedangkan fraksi sekuen diad (BL-VL), (VL-BL), dan (VL-VL) cenderung lebih kecil (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa dalam kopolimer cenderung lebih banyak mengandung blok BL dan blok VL dibandingkan kopolimer statistik seperti yang diharapkan.

Dari hasil terakhir tersebut dan nilai faktor kereaktifan monomer dapat diusulkan bahwa pada awal kopolimerisasi kopolimer yang terbentuk tersusun dari blok PVL yang panjang, kemudian dengan meningkatnya waktu polimerisasi komposisi monomer VL menurun dan akhirnya terbentuk blok PHB. Pembentukan kopolimer dapat digambarkan sebagai berikut :



Interpretasi ini mengusulkan bahwa kopolimer diperkirakan tersusun dari campuran homopolimer atau kopolimer blok dengan ukuran blok yang bervariasi.

4. Kesimpulan

Dari analisis faktor kereaktifan monomer terhadap katalis yang digunakan menunjukkan bahwa kereaktifan monomer δ -valerolakton (δ -VL) lebih tinggi dibandingkan kereaktifan monomer β -butirolakton (β -BL) ($r_{VL} = 7,89$, dan $r_{BL} = 0,65$). Dari hasil tersebut diperkirakan bahwa kopolimer hasil sintesis tersusun dari campuran homopolimer PVL dengan sekuen lebih panjang dan PHB dengan sekuen yang lebih pendek. Dari analisis distribusi sekuen diad kopolimer diperkirakan bahwa kopolimer hasil sintesis tersusun dari campuran homopolimer dengan kopolimer blok dengan ukuran blok bervariasi. Sedangkan berdasarkan analisis sifat termalnya, kopolimer memiliki temperatur transisi glass tunggal yang berada diantara temperatur transisi glass homopolimer murninya. Analisis ini dapat mendukung analisis distribusi sekuen diad bahwa kopolimer hasil sintesis merupakan campuran polimer yang homogen dan kompatibel.

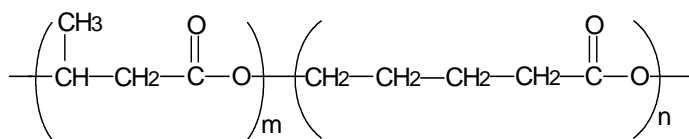
5. Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Departemen Kimia - ITB atas kerja sama dan fasilitas yang telah diberikan. Penelitian ini telah dibiayai dari dana Penelitian Hibah Bersaing X, Tahun Anggaran 2002 dan 2003 (No. 015/LIT/BPPK-SDM/IV/2002 dan No. 12/P2IPT/DPPM/PHBL/III/2003).

6. Referensi

- Arcana, I.M., (1999), Chemical synthesis of poly(R,S)- β -hydroxybutyrate by tetraisobutyl-dialuminumoxane catalyst, *Journal Mathematic and Sciences*, 4, 226
- M. Arcana, B. Tanajaya, C.L. Radiman, dan M.A. Sulfikar, (2004), Pembentukan kopolimer dari monomer β -butyrolakton dan δ -valerolakton dengan katalis aluminoksan, *Prosiding Seminar MIPA IV*, Fakultas MIPA-ITB, Bandung,
- Billingham, N.C., Proctor, M.G., and Smith, J.D., (1988), *J. Organomet. Chem.*, 34, 83
- Billingham, N.C., Proctor, M.G., and Smith, J.D., (1989), *Eur. Polym. J.*, 25(1), 15
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L., and Marchessault, R.H., (1987), Synthesis of crystalline β -hydroxy-butyrates / β -hydroxyvalerate copolymers by coordination polymerization of β -lactones, *Macromolecules*, 20, 3086
- Doi, Y., Kanesawa, Y., Kunioka, M., and Saito, T., (1990), *Macromolecules*, 23, 26,
- Dubois, Ph., Degee, Ph., Jerome, R., Teyssie, Ph., (1993), *Macromolecules*, 26, 2730
- Kricheldorf, H.R., Scharnagl, N., (1989), *J. Macromol. Sci. Chem.*, A26(7), 951 .
- Kunioka, M., and Doi, Y., (1990), *Macromolecules*, 23, 1933.
- Randall, J.C., (1977), Polymer Sequence Determination C-13 NMR Method, *1st Ed.*, Academic Press Inc., New York p.53, 135.

Lampiran



Gambar 1. Struktur P(HB-co-VL)

Tabel 1. Komposisi komonomer HB dan VL dalam kopolimer

No.	Komposisi ^a BL/VL	Komposisi ^b PHB/PVL
1	100/0	100/0
2	90/10	90/10
3	70/30	69/31
4	50/50	48/52
5	30/70	26/74
6	10/90	11/89
7	0/100	0/100

^aData komposisi monomer dalam mol ; ^bData komposisi unit komonomer dalam kopolimer dalam mol ditentukan dengan spektroskopi RMN ¹H

Tabel 2. Analisis termal dengan DSC untuk kopolimer P(HB-co-VL)

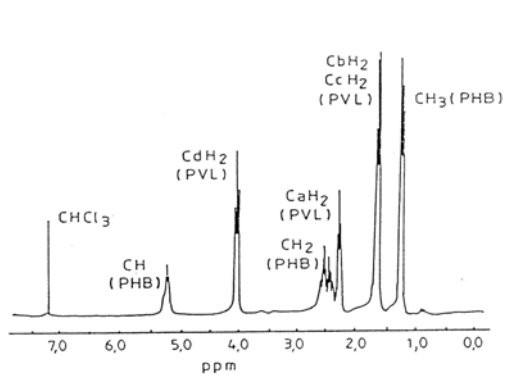
No.	Komposisi ^d PHB/PVL	Eksperimen T _g ^a (°C)	Perhitungan T _g ^b (°C)	Perhitungan T _g ^c (°C)	T _m ^a (°C)	ΔH _m ^a (J/g)
1	100/0	2,0	2,0	2,0	-	-
2	90/10	-4,5	-7,0	-7,3	-	-
3	69/31	-16,7	-24,0	-25,8	-	-
4	48/52	-30,2	-38,4	-39,6	-	-
5	26/74	-43,2	-50,6	-51,1	-	-
6	11/89	-54,0	-57,6	-57,9	35,8	34,4
7	0/100	-62,7	-62,7	-62,7	52	64,8

^aDitentukan langsung dari termogram DSC; ^bHasil perhitungan dari persamaan Fox; ^cHasil perhitungan dari persamaan Couchman-Karasz. ^dData komposisi unit komonomer dalam kopolimer dalam mol ditentukan dengan spektroskopi RMN ¹H

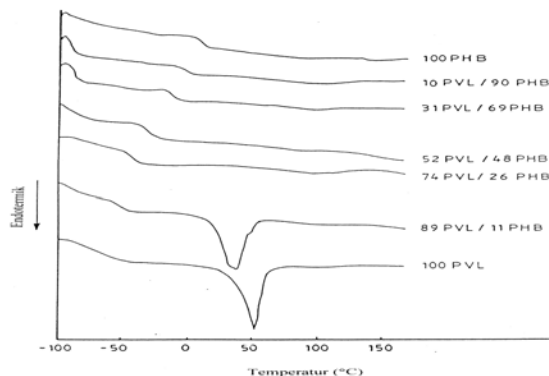
Tabel 3. Fraksi sekuen diad hasil eksperimen dan hasil Perhitungan untuk P(HB-co-VL)

No.	Rasio BL/VL	Rasio ^a PHB/PVL	(BL-BL) Observasi ^b (Hitungan) ^c	(BL-VL) Observasi ^b (Hitungan) ^c	(VL-BL) Observasi ^b (Hitungan) ^c	(VL-VL) Observasi ^b (Hitungan) ^c
1	100/0	100/0	1,00 (1,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
2	90/10	90/10	0,82 (0,81)	0,06 (0,09)	0,08 (0,09)	0,04 (0,01)
3	70/30	69/31	0,61 (0,48)	0,14 (0,21)	0,13 (0,21)	0,12 (0,10)
4	50/50	48/52	0,37 (0,23)	0,17 (0,25)	0,19 (0,25)	0,27 (0,27)
5	30/70	26/74	0,15 (0,07)	0,16 (0,19)	0,19 (0,19)	0,50 (0,55)
6	10/90	11/89	0,00 (0,01)	0,07 (0,10)	0,09 (0,10)	0,84 (0,79)
7	0/100	0/100	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (1,00)

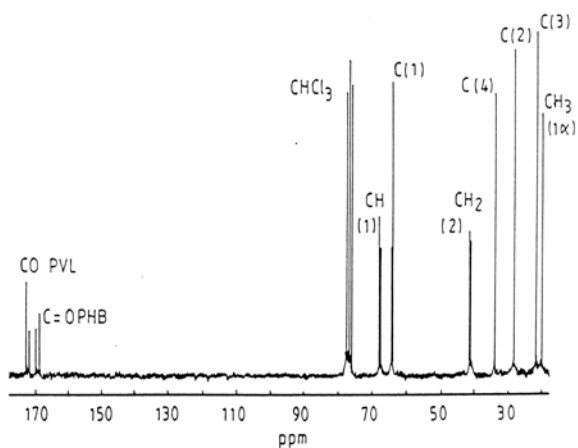
^aData komposisi unit komonomer dalam mol, ditentukan dengan spektroskopi NMR ¹H. ^bHasil observasi intensitas puncak relatif untuk karbon karbonil dari setiap sequence diad komonomer (Gb. 3b). ^cHasil perhitungan dari persamaan Model Statistik Bernnoullian



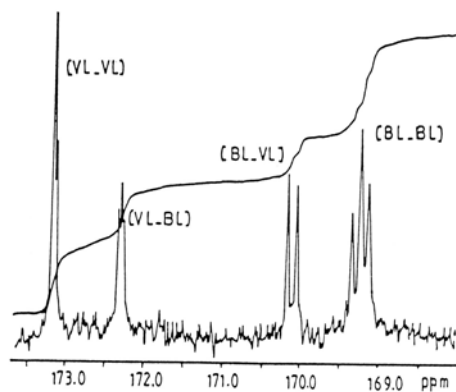
Gambar 2. Spektra RMN ¹H pada 400 MHz untuk P(48HB-co-52VL)



Gambar 3. Termogram DSC untuk P(HB-co-VL) sebagai fungsi komposisi PHB/PVL



Gambar 4a. Spektra RMN ¹³C pada 100 MHz untuk P(48HB-co-52VL)



Gambar 4b. Perluasan puncak resonansi karbon karbonil pada spektra RMN ¹³C pada 100 MHz untuk P(48HB-co-52VL)

Sintesis *Forbazol* Baru dan Turunannya

I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja

Jurusan Pendidikan Kimia, FPMIPA, IKIP Negeri Singaraja, Jalan Udayana Singaraja, Bali 81117
e-mail: wayanmuderawan@yahoo.com.au

Abstrak

Telah dilakukan penelitian sintesis terhadap *forbazol* dan turunannya. *Forbazol B*, baru dan turunannya dapat disintesis melalui 4 tahap reaksi dari sinton *A* dan *B* dengan rendemen yang tinggi.

Sinton *A*, 1-(*p*-tosil)pirol-2-karbonil klorida, dapat disintesis dari pirol melalui dua langkah reaksi yaitu : (i) reaksi substitusi atom hidrogen dengan gugus tosil menghasilkan *p*-tosil pirol dan (ii) reaksi asilasi Fridel-Crafts terhadap *p*-tosil pirol untuk menghasilkan 1-(*p*-tosil)pirol-2-karbonil klorida. Sedangkan sinton *B*, suatu garam fenasil amonium klorida, dapat disintesis dari asetofenon melalui tiga tahap reaksi yaitu : (i) reaksi brominasi dengan menggunakan dioksan dibromida menghasilkan fenasil bromida dan turunannya, (ii) reaksi substitusi dengan menggunakan heksametilenatetramina menghasilkan suatu garam amonium kuaterner dan (iii) reaksi pembentukan garam fenasil amonium klorida.

Kerangka dasar *forbazol* dan turunannya dapat disintesis dari sinton *A* dan *B* melalui tiga tahap reaksi yaitu: (i) reaksi penggabungan kedua sinton tersebut dalam piridin untuk menghasilkan suatu amida, (ii) siklodehidrasi senyawa amida dengan menggunakan pereaksi fosforoksiklorida menghasilkan senyawa oksazol terproteksi dan (iii) hidrolisis senyawa oksazol terproteksi dengan basa NaOH dalam metanol menghasilkan kerangka dasar *forbazol* dan kerangka dasar turunannya.

Selanjutnya *forbazol* dan turunannya dapat disintesis langsung dari kerangka dasarnya melalui reaksi substitusi elektrofilik aromatik, S_EAr , dengan menggunakan pereaksi sulfuril klorida.

Kata kunci : *forbazol*, reaksi penggabungan, siklodehidrasi, hidrolisis, klorinasi.

1. Pendahuluan

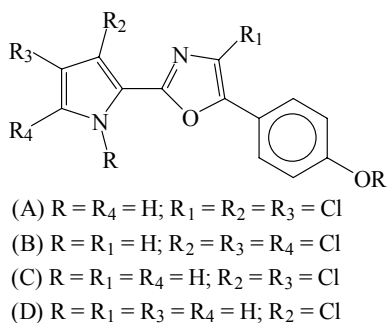
Sebagai akibat dari munculnya dan berkembangnya berbagai jenis penyakit yang berpotensi membunuh seperti penyakit jantung, kanker, AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), SARS (*Severe Accute Respiratory Syndrome*) dan lain-lain, pemburuan senyawa bahan alam aktif yang dapat digunakan sebagai obat yang efektif untuk menyembuhkan berbagai penyakit dilakukan secara besar-besaran oleh negara-negara maju. Usaha untuk mendapatkan senyawa aktif baru dari berbagai sumber alami, flora dan fauna, telah dimulai sejak lama dan pada akhir-akhir ini berkembang sangat pesat, tidak saja pada organisme darat tetapi juga organisme laut. Telah banyak ditemukan senyawa aktif dari organisme laut untuk terapi berbagai jenis penyakit, karena organisme laut merupakan

gudangnya metabolit sekunder dan sebagai sumber senyawa organik bahan alam.

Senyawa bahan alam alkaloid yang mengandung oksazol umumnya bersifat bioaktif, akan tetapi jarang ada di alam. Sampai saat ini hanya ditemukan beberapa senyawa alkaloid antibiotik yang mengandung cincin oksazol dan alkaloid bioaktif yang berasal dari laut sering kali mengandung oksazol 2,5-tersubstitusi sederhana (Lindquist dkk. 1991, Ichiba dkk. 1991, Matsunaga dkk. 1991). *Forbazol A-D* yang diisolasi dari sponge Indo-Pasifik, *Phorbas aff. Clathrata*, telah teridentifikasi strukturnya dan diketahui sebagai turunan alkaloid oksazol baru yang mengandung unit fenilpiroliloksazol terklorinasi, karena itu dinyatakan sebagai klas baru dari alkaloid yang berasal dari laut (Rudi

I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja

dkk. 1994). Keempat *forbazol* ini, A-D, cukup unik karena belum pernah ditemukan di alam dan keempat *forbazol* ini mengandung kerangka dasar sama, hanya berbeda satu sama lainnya dalam substitusi atom klor sepanjang kerangka dasar tersebut, Gambar 1.



Gambar 1. Struktur molekul *forbazol* A-

Keempat senyawa tersebut diekstrak dari spong *Phorbas aff. clathrata* dengan pelarut etil asetat dan satu sama lainnya dipisahkan dengan kromatografi *flash* vakum dan kolom sephadex LH-20 dari ekstrak etil asetatnya, dan diperoleh *forbazol* A (2,5 %), *forbazol* B (0,25 %), *forbazol* C (0,025 %) dan *forbazol* D (0,01%) (Rudi dkk. 1994). Keempat *forbazol* tersebut telah ditentukan strukturnya dengan difraksi sinar-X dan teknik resonansi magnet inti 1D dan 2D. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa *forbazol* memiliki efek imunomodulatori. Karena kadarnya yang sangat sedikit dan menunjukkan sifat aktivitas biologis maka perlu usaha untuk mensintesisnya di laboratorium sehingga tersedia dalam jumlah yang cukup untuk keperluan penelitian tentang uji bioktivitas dan keperluan lainnya.

Fragmen terpenting dari struktur dasar *forbazol* adalah sistem oksazol, karena itu dalam usaha untuk mensintesis *forbazol* yang terpenting adalah mencari metode sintesis untuk membuat sistem oksazol tersebut. Usaha untuk mensintesis senyawa *forbazol* telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Loughlin dkk (1999) telah berhasil mensintesis kerangka dasar oksazol dari karbonil klorida dan fenasil amina. Sedangkan Radspieler dan Liebscher (2001) berhasil mengembangkan metode sintesis senyawa klorooksazol dari asil sianida, aldehid dan hidrogen klorida, dan menggunakan metode tersebut untuk mensintesis isomer *forbazol* A, akan tetapi gagal menggunakan metode tersebut untuk mensintesis *forbazol* A.

Tulisan ini menguraikan sintesis *forbazol* baru dan turunannya.

2. Percobaan

Sinton A dan B dibuat sesuai dengan prosedur yang dilaporkan oleh Loughlin dkk (1999).

2.1 Reaksi penggabungan sinton A dan B.

Sinton A **2** (0,02 mol) dan sinton B **5** (0,02 mol) dilarutkan dalam piridin (20 mL) dan diaduk pada suhu kamar selama 48 jam. Air (50 mL) ditambahkan pada campuran reaksi dan lapisan airnya diekstrak dengan kloroform (3 x 50 mL). Gabungan lapisan organiknya dibilas dengan larutan jenuh Na₂CO₃ dan larutan jenuh NaCl, kemudian keringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, dan pelarutnya diuapkan dengan rotavapor vakum. Residu yang diperoleh direkristalisasi dengan menggunakan pelarut diklorometana-heksana sehingga diperoleh senyawa amida berupa kristal berwarna coklat. Titik leleh senyawa **6a**: 116-119°C; senyawa **6b**: 142 - 143°C.

2.2. Reaksi siklodehidrasi

Senyawa karboksamida **7** hasil penggabungan (0,01 mol) dilarutkan dalam fosfor oksiklorida (50 ml) yang baru didistilasi dan direfluks selama 2 jam pada suhu 110°C, kemudian dibiarkan suhunya turun hingga mencapai suhu kamar dan diaduk lebih lanjut selama 2 jam. Kelebihan fosfor oksiklorida diuapkan dengan evaporator di bawah pengurangan tekanan, sehingga diperoleh suspensi coklat gelap. Ke dalam suspensi tersebut ditambahkan dengan air (25 mL) dan larutan amoniak sehingga larutan menjadi basa. Larutan dalam air yang diperoleh diekstrak dengan diklorometana (3 x 50 mL), dan hasil ekstraksi dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat. Diklorometana diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh padatan yang selanjutnya direkristalisasi dengan pelarut diklorometana-heksana untuk mendapatkan kristal coklat. Titik leleh senyawa **7a**: 108-109°C; senyawa **7b**: 152-153°C.

2.3 Reaksi hidrolisis

Senyawa oksazol **7** hasil siklisasi (7,6 mmol) dan sodium hidroksida (15 mL, 5M) dalam metanol (25 mL) dipanaskan dan direfluks selama 3,5 jam, kemudian metanolnya diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh residu. Residu dalam air diekstrak dengan etil asetat (3 x 25 mL) dan ekstrak yang diperoleh dibilas dengan larutan natrium klorida, dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, dan

I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja

diuapkan pelarutnya dengan evaporator sehingga diperoleh padatan. Padatan direkristalisasi dengan menggunakan pelarut diklorometana-heksana untuk menghasilkan kristal murni berupa jarum berwarna coklat. Titik leleh senyawa **8a**: 217-218°C; senyawa **8b**: 165,6-166,5°C.

2.4 Klorinasi

Senyawa oksazol **8** (1.0 mmol) dilarutkan dalam dietil eter bebas air (25 mL). Setelah didinginkan dalam penangas air-es, ke dalam larutan tersebut kemudian ditambahkan sulfuril klorida (1.0 mmol atau 3.5 mmol) dan sambil diaduk suhu dibiarkan naik sehingga mencapai suhu kamar selama 5 jam. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan heksana (10 mL) dan kemudian padatan yang terbentuk disaring. Padatan yang diperoleh dikeringkan dalam vakum selama satu malam. Titik leleh senyawa **9a**: 192-193°C; senyawa **9b**: 198-199°C; senyawa **9c**: 268-269°C; senyawa **9d**: 252-253°C.

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Sintesis sinton A dan B

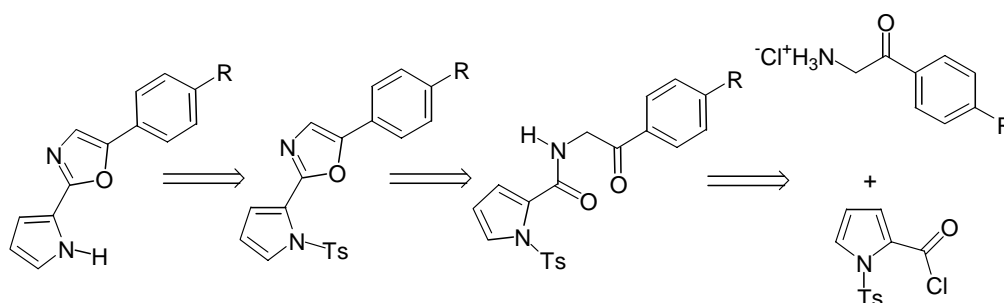
Bila dianalisis dengan metode retro-sintesis, (Skema 1), cincin oksazol dari senyawa *forbazol* dapat disintesis dari sinton A, karbonil klorida, dan sinton B, fenasil anina, melalui reaksi penggabungan dan diikuti dengan reaksi siklisasi. Kedua sinton tersebut masing-masing dapat dibuat dari senyawa sederhana pirol dan asetofenon.

Sinton A diperoleh dengan terlebih dahulu membuat senyawa N-tosilpirol **1** dari pirol dengan logam kalium yang diikuti dengan penambahan *p*-toluensulfonyl klorida. N-tosilpirol **1** diasilasi secara regeoselektif melalui reaksi asilasi Friedel-Crafts dengan menggunakan oksalil klorida dan katalis asam Lewis $AlCl_3$ untuk menghasilkan 1-(*p*-tosil)pirol-2-karbonil klorida **2**, Skema 2.

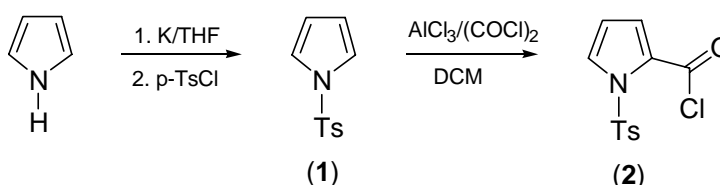
Sinton B dapat disintesis melalui beberapa tahap reaksi, Skema 3. Diawali dengan reaksi antara asetofenon dengan dioksan dibromida yang dibuat dari 1,4-dioksan dan brom (Billimoria dan Maclagan, 1954) menghasilkan fenasil bromida **3**, yang lebih lanjut direaksikan dengan heksametilenetetramina (Blazevic dkk. 1979) menghasilkan suatu garam **4**. Garam **4** ini dengan asam klorida dalam metanol memberikan garam fenasilamonium klorida **5** (Hall dkk. 1992).

3.2 Sintesis Kerangka Dasar *Forbazol*

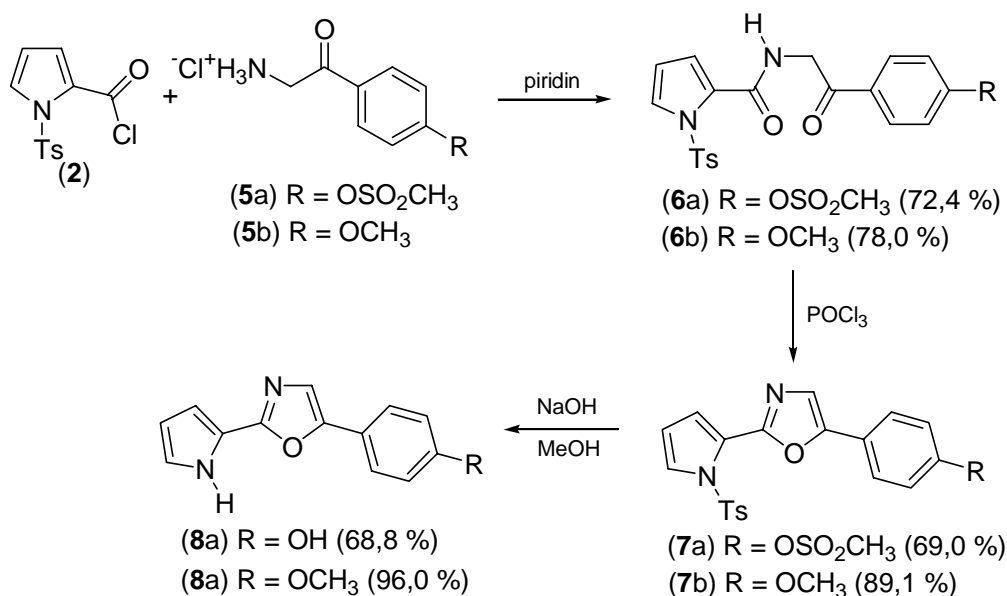
Penggabungan sinton A terproteksi **2** dengan sinton B terproteksi **5a** menghasilkan senyawa amida **6a** ($R = OSO_2CH_3$), Skema 4. Siklisasi senyawa amida **6a** berhasil dilaksanakan dengan menggunakan pereaksi fosfor oksiklorida, $POCl_3$, pada 110°C menghasilkan senyawa oksazol **7a** dengan rendemen sangat baik. Fosfor oksiklorida merupakan pereaksi siklodehidrasi terbaik dan mengungguli reagen siklodehidrasi lainnya seperti asam fosfat, H_3PO_4 , asam sulfat, H_2SO_4 , atau tionil klorida,



Skema 1. Retrosintesis *forbazol*



Skema 2. Sintesis sinton A.

Skema 4. Sintesis kerangka dasar *forbazol*

SOCl₂, yang memberikan campuran produk yang kompleks atau tidak memberikan hasil reaksi.

Deproteksi atau penghilangan gugus pelindung nitrogen pirol dan metanasulfonil dari kerangka *forbazol* terproteksi **7a** diperlukan untuk menghasilkan kerangka dasar *forbazol*. Deproteksi gugus tosil pada senyawa **7a** dapat dilakukan melalui reaksi hidrolisis dengan natrium hidroksida (NaOH) dalam air-metanol pada kondisi refluks selama 3,5 jam, dan dihasilkan kerangka dasar *forbazol* **8a** (R = OH), Skema 4. Dengan metode yang sama, maka dapat disintesis kerangka dasar turunan *forbazol* **8b** (R = OCH₃) dari sinton A **2** dan sinton B **5b** dengan rendemen masing-masing reaksi cukup tinggi, Skema 4.

Penentuan struktur kerangka dasar *forbazol* dan turunannya dilakukan dengan menggunakan spektrometer resonansi magnet inti (RMI), baik proton (¹H) dan karbon (¹³C) selain UV-Vis dan IR. Semua resonansi atau sinyal hidrogen pada kerangka dasar *forbazol* dan turunannya muncul pada daerah *downfield* ini menunjukkan bahwa semua atom hidrogen yang terikat langsung pada kerangka dasarnya terikat pada Csp². Sedangkan resonansi hidrogen pirol muncul jauh pada *downfield* yang menunjukkan bahwa hidrogen tersebut bersifat asam. Data RMI ¹³C juga menunjukkan bahwa semua karbon kerangka dasar *forbazol* dan turunannya

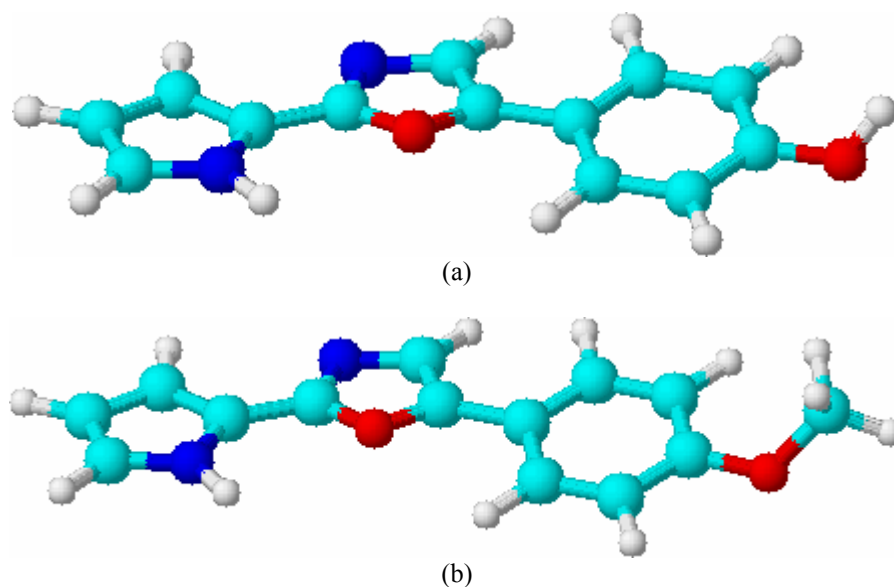
merupakan Csp², ini berarti struktur senyawa kerangka dasar *forbazol* dan turunannya mendekati bidang datar. Hal ini sesuai dengan model struktur tiga dimensi yang dibuat dengan menggunakan program *software ACD/Chemsket Versi 5.2*, Gambar 2. Sudut torsi (*torsion angle*) antara bidang yang dibentuk oleh cincin pirol dengan cincin oksazol dan cincin oksazol dengan cincin benzena masing-masing sekitar 1° dan -9°. Ini berarti sudut torsi antara bidang yang dibentuk oleh cincin pirol dengan bidang yang dibentuk oleh cincin benzena sekitar 10°. Ini berarti pula struktur kerangka dasar *forbazol* mendekati bidang datar, dan ini memungkinkan terjadinya delokalisasi elektron atau konyugasi pada semua bagian kerangka dasar *forbazol*. Dari data dan analisis tersebut menunjukkan bahwa struktur senyawa yang diperoleh adalah benar dan sesuai dengan yang diharapkan.

3.3 Sintesis Forbazol dan Turunannya

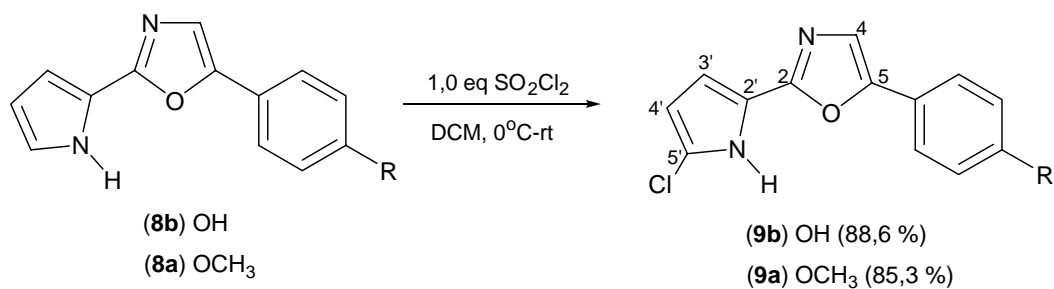
Forbazol dan turunannya disintesis dengan mereaksikan kerangka dasarnya dengan pereaksi sulfuril klorida, SO₂Cl₂. Dengan menggunakan 1 mol ekuivalen SO₂Cl₂ diperoleh hasil mono klorinasi, Skema 5. Hal ini dapat dilihat dari hilangnya satu sinyal H pada hasil klorinasi menunjukkan telah terjadi mono klorinasi.

Klorinasi merupakan reaksi substitusi elektrofilik pada sistem pirol dan ternyata

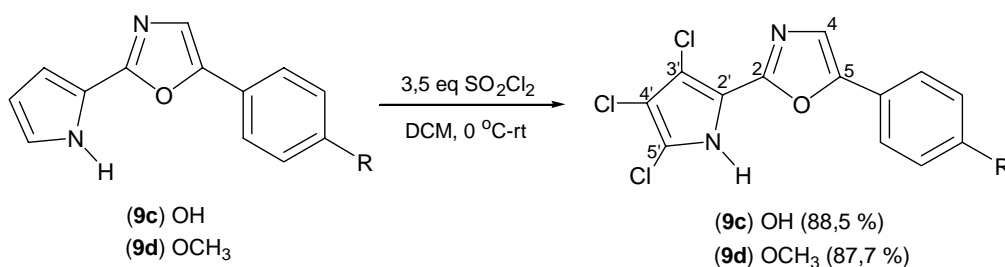
I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja



Gambar 2. Struktur tiga dimensi (a) senyawa **8a** (R = OH) (b) senyawa **8b** (R = OCH₃).



Skema 5. Sintesis forbazol dan turunannya.



Skema 6. Klorinasi dengan 3,5 mol ekuivalen SO₂Cl₂.

substitusi terjadi pada atom karbon nomor 5'. Hal ini dapat diketahui dari analisis struktur molekulnya dengan menggunakan RMI. Pada spectrum RMI ¹H senyawa kerangka dasar *forbazol* maupun turunannya **8** memiliki tiga jenis resonan untuk H pada sistem pirolnya, yaitu H3', H4' dan H5'. Setelah klorinasi signal H5' lenyap sedangkan signal H3' dan H4' pada senyawa hasil klorinasi **9** masih. Ini berarti reaksi substitusi elektofilik memberikan hasil

mono klorinasi pada C5' sistem pirol. Dengan demikian *forbazol* dan turunannya yang diperoleh melalui sintesis ini merupakan senyawa baru dimana klor terikat pada C5' dalam sistem kerangka dasarnya dan berbeda dengan ke empat *forbazol* sebelumnya yang ditemukan oleh Rudi, dkk., dimana pada C5' adalah terikat atom H dan klor tersebar pada C3' dan 4'. Perbedaan data RMI ¹H juga didukung oleh data RMI ¹³C setelah

I Wayan Muderawan dan I Wayan Suja

dibandingkan dengan data RMI *forbazol D*, yang merupakan satu-satunya *forbazol* dengan mono klor pada sistem pirol dari *forbazol* yang telah diketahui.

Reaksi antara kerangka dasar *forbazol* dan turunannya dengan 3,5 mol ekuivalen SO_2Cl_2 pada 0 – 25°C selama 5 jam memberikan hasil substitusi trikloro seperti pada Skema 6. Ini berarti ketiga posisi yang ada pada sistem pirol reaktif, sedangkan C4 pada sistem oksazol tidak reaktif pada kondisi tersebut.

RMI menunjukkan bahwa setelah klorinasi ketiga resonan untuk hidrogen pada sistem pirol, yaitu H3', H4' dan H5', tersebut hilang. Ini berarti reaksi substitusi elektrofilik memberikan hasil triklorinasi pada C3',4',5' sistem pirol. Dengan demikian *forbazol 9c* yang diperoleh melalui sintesis ini sama dengan *forbazol B* dan turunannya *9d* merupakan senyawa baru dimana klor terikat pada C3',4',5' dalam sistem kerangka dasarnya.

4. Kesimpulan

Forbazol B, *forbazol* baru dan turunannya dapat disintesis melalui reaksi penggabungan sinton A dan B, yang diikuti dengan siklodehidrasi, hidrolisis dan reaksi klorinasi langsung dari kerangka dasarnya melalui reaksi substitusi elektrofilik aromatik, $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$, dengan menggunakan pereaksi sulfuril klorida.

5. Ucapan terima kasih

Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada pengelola RUT VIII-X dan Kementerian Riset dan Teknologi atas dana yang diberikan.

6. Daftar Pustaka

Ichiba, T., Yoshida, W.Y., Scheuer, P.J., Higa, T., Gravalos, D.G., (1991). Hennoxazoles : Bioactive Bisoxazoles from Marine Sponge, *J. Am.Chem. Soc.*, 113, 3173.

Lindquist, N., Fenical, W., Van Duyne, G.D., Clardy, J. (1991). Isolation and Structure Determination of Diazonamides A and B, Usual Cytotoxic Metabolites from the Marine Ascidian *Diazona chinensis*, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 2303.

Loughlin, W. A., Muderawan, I W., McCleary, M.A., Volter, K.A., King, M.D., (1999). *Studies Towards the Synthesis of Forbazoles A-D: Formation of Pyrrole Oxazole Skeleton*, *Austr. J. Chem.*, 52, 231-234.

Matsunaga, S., Fujiki, H., Sakata, D., Fusetani, N., (1991). Calyculins E,F,G, and H, Additional Inhibitors of protein 1 and 2A, from the Marine Sponge *Discodermia calyx*, *Tetrahedron*, 47, 2999.

Radspieler, A., Liebscher, J., (2001). Synthesis of Chlorooxazoles Related to Natural Products, *Synthesis*, 5, 745-750.

Rudi, A., Stein, Z., Green, S., Golberg, I., Kashman, Y., Banayahu, Y., Schleyer, M., (1994). Phorbazoles A-D, Novel Chlorinated Phenylpyrrolyloxazoles from the Marine Sponge *Phorbas aff. Clathrata*, *Tetrahedron Letts.*, 35, 2589.

Asalan Batuan Serpentinit Di Sepanjang Sempadan Jalur Tengah Dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia

Ibrahim Abdullah & Jatmika Setiawan
iba@pkrisc.cc.ukm.my, jatmikasetiawan@hotmail.com

Program Geologi, Pusat Pengajian Sains Sekitaran Dan Sumber Alam,
Fakulti Sains Dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Abstrak

Singkapan-singkapan kecil jasad serpentinit di sepanjang sempadan Jalur Tengah dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia membentuk jajaran pada arah antara $U340^{\circ}T-U350^{\circ}T$. Singkapan yang paling besar meliputi 7 km x ½ km yang didapati di Ceruh. Jajaran ini dikenali sebagai Garisan Bentong Raub atau Sutura Bentong. Jasad-jasad serpentinit tersebut tersingkap di Bukit Rokan Barat, Kampung Selaru, Petasih (Negeri Sembilan), Cheruh-Bentong (Negeri Pahang) dan Kelantan barat. Jasad-jasad serpentinit ini mempamerkan struktur-struktur yang dapat menjelaskan sejarah canggaan (deformasi) yang berlaku di sepanjang sempadan Jalur Tengah dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia. Daripada data sesar didapati bahawa jasad-jasad serpentinit tersebut pernah mengalami empat fasa canggaan. Hasil analisis kimia dengan kaedah "XRF", menunjukkan bahawa batuan serpentinit ini mempunyai kandungan SiO_2 antara 40.51% hingga 46.05%. Jasad serpentinit ini kemungkinan berasal dari batuan ultra bes peridotit yang merupakan batuan bahagian dari kerak samudra.

Kata kunci: Jasad serpentinit, canggaan, dan peridotit

1. Pendahuluan

Jasad-jasad kecil serpentinit yang bertabur hampir mengutara (utara barat-laut-selatan tenggara:UBL-STG) di sebelah timur Banjaran Titiwangsa dicadangkan oleh Hatchison, 1973, sebagai menandai parit subduksi Paleozoik bawah. Parit tersebut dipercayai sempadan di permukaan antara kerak lautan di timur dan kerak kebenuaan di barat. Parit Subduksi ini dikenali sebagai Garisan Bentong. Hutchison, 1977, menafsirkan Garisan Bentong sebagai zon sesar normal yang berakar dalam. Oleh itu bahan mafik dan ultramafik daripada mantel atas boleh mendaki menerusi zon sesar dan menerbitkan jasad-jasad yang kemudian berubah kepada serpentinit. Lakaran yang menggambarkan keadaan tersebut dinyatakan terjadi pada Trias Akhir. Michell, 1977, pula mencadangkan bahawa batuan Garisan Bentong wujud dalam lembangan hadapan arka dan telah bercampur dengan batuan yang telah terbit pada arka tektonik dan juga arka magma. Bignell dan Snelling, 1977, juga menganggap

batuan dalam Garisan Bentong berasal daripada sebuah lembangan tepian antara parit subduksi di timur dan sebuah mikrobenua (yang meliputi Grik serta Baling) di barat. Pemikiran mengenai kewujudan Garisan Raub-Bentong meramalkan rejim tektonik mampatan yang disebabkan perlanggaran antara kepingan lithosfera. Berlainan dengan pendapat Tan (1981, dalam Khoo & Tan, 1983) yang menyatakan garisan itu sebagai zon sesar turun yang berakar dalam dan oleh itu memberi jalan kepada bahan mefik bergerak ke atas dari mantel atas.

Sutura Bentong (Tjia, 1989) meliputi batuan berusia Paleozoik bawah hingga tengah yang terdapat di kaki timur Banjaran Titiwangsa. Zon batuan ini selebar lebih kurang 13 km membentang utara-selatan bermula dari sempadan Malaysia-Thailand di sebelah barat kampung Tomo dan disaliri Sungai Tiang dan Sungai Mangga. Pada peta rantau (Jabatan Penyiasat Kajibumi, 1985) jalur batuan ini dinyatakan berumur Ordovisi-Silur. Ke selatan,

granitoid Gunung Noring dan Gunung Camah merupakan pemisah daripada kelanjutannya iaitu di tepi barat Negeri Pahang dan boleh ditandai dengan Sungai Berias - Kuala Betis - Ulu Sungai Nenggiri - Sungai Telom - Cheroh - barat Raub - Teranum - Bentong - Karak. Dari Karak arah taburan batuan bertukar kepada selatan-tenggara mengikuti Sungai Telemong - Durian Tipus - Pertang - Kuala Pilah dan Bahau - Air Kuning - Jasin. Dekat Pertang dan Air Kuning dan dianjak ke kiri sejauh 10-20 km sepanjang ruas Zon Sesar Kuala Lumpur yang berjurus N110° – 120°E.

Pata pada Rajah 1 menunjukkan lokaliti pengambilan sampel untuk dianalisis di sepanjang sempadan antara Jalur Barat dan Jalur Tengah Semenanjung Malaysia.

Observasi Lapangan

Observasi lapangan dilakukan pada singkapan-singkapan serpentinit di sepanjang sempadan (batas) Jalur Tengah dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia, antara lain Bukit Rokan Barat, Kampung Selaru, Petasih, Cheruh-Bentong dan Kelantan Barat, seperti ternampak pada Rajah 1.

sLokaliti Bukit Rokan Barat

Diskripsi singkapan serpentinit : Singkapan segar sepanjang 30 meter dan lebar 10 meter, berwarna hijau tua-putih terletak di tepi jalan masuk ke kampung Bukit Rokan Barat Singkapan serpentinit nampak terpotong-potong oleh ricih yang kuat sehingga terbentuk boudinage yang pada permukaannya nampak licin seperti sabun dan mengadungi gores yang sangat jelas. Struktur am : Secara am jasad serpentinit miring ke arah timur dengan dip antara 60°-70° selari dengan jurus dan kemiringan foliasi filit-syis yang melingkupinya iaitu N330°E/45°. Ricih berkedudukan antara N330°E – N350°E/60° – 70°, kemiringan dan liniasi gores-garis antara 30°-45°, N180°E – N190°E. dan merupakan hasil dari sesar mendatar kanan songsang Seluruh struktur ini dipotong oleh sesar mendatar kanan N20°E/80°. Struktur minor di dalam jalur ricih ternampak lipatan berskala kecil dengan tunjaman 30° kearah N300°E sebagai hasil daripada pergerakan sesar mendatar kiri songsang. Sayatan nipis dari contoh batuan serpentinit ini memperlihatkan hampir semua mineral asal sudah berubah menjadi mineral serpentin (Rajah 2A). Hasil analisis kimia dengan metoda “XRF” daripada

batuan serpentinit ini menghasilkan kandungan SiO₂ ialah 41.04%.

Lokaliti Kampung Selaru

Panjang keseluruhan singkapan kurang lebih 150 meter dan lebar 30 meter. Singkapan segar sepanjang 10 meter tersingkap di tepi jalan Selaru-Petasih, berwarna segar hijau tua-putih, terpotong-potong ricih sehingga terbentuk struktur boudinage yang pada permukaannya nampak licin seperti sabun dan mengadungi gores yang jelas. Jasad serpentinit ini membentuk liniasi antara N340°E-N350°E, selari dengan jurus dan kemiringan foliasi batuan filit-syis yang melingkupinya iaitu N345°E/60°, struktur tersebut terpotong oleh sesar dengan kedudukan N165°E/30° berupa sesar mendatar kanan songsang (naik), seperti terlihat pada Tabel 1. Dari contoh batuan serpentinit ini memperlihatkan hampir semua mineral asal sudah berubah menjadi mineral serpentin (Rajah 2B). Hasil analisis kimia dengan metoda “XRF” daripada batuan serpentinit ini menghasilkan kandungan SiO₂ ialah 41.39%.

Lokaliti Petasih

Diskripsi singkapan serpentinit adalah segar dengan panjangnya 15 meter dan lebar 5 meter, dijumpai di belakang dewan sekolah kebangsaan Petasih. Singkapan ini berwarna hijau tua dengan permukaan yang licin dan memperlihatkan gores . Pada kekar tensi terisi mineral karbon. Kedudukan foliasi batuan filit-syis N320°E/80°. Jasad serpentinit di sini membentuk liniasi antara N315°E-N320°E/80° dan merakam empat generasi sesar seperti terlihat pada Tabel 1. Sayatan nipis dari contoh batuan serpentinit ini memperlihatkan hampir semua mineral asal sudah berubah menjadi mineral serpentin (Rajah 2C). Analisis kimia dengan metoda “XRF” daripada batuan serpentinit ini menghasilkan kandungan SiO₂ ialah: 46.05% (selengkapnya seperti terlihat pada Tabel 2)

Lokaliti Cheruh-Bentong

Diskripsi singkapan serpentinit di sini beberapa kilometer, berupa bukit memanjang dengan liniasi N350°E, berwarna segar hijau tua-putih. Kedudukan foliasi batuan filit-syis N320°E-N350°E/80° selari dengan kedudukan Jasad serpentinit yang membentuk liniasi antara N315°E-N320°E/80° dan banyak merakam sesar. Sayatan nipis dari contoh batuan serpentinit ini memperlihatkan sebahagian

daripada mineral asal sudah berubah menjadi mineral serpentin dan sebahagian yang lain masih menunjukkan mineral batuan asal yang mengandungi olivine lebih dari 10% dan memperlihatkan struktur optik (Rajah 2D). Analisis kimia : hasil analisis kimia dengan metoda "XRF" daripada batuan serpentin ini menghasilkan kandungan SiO_2 : 40.51% (selengkapnya seperti terlihat pada Tabel 2)

Lokality Kelantan barat

Diskripsi singkapan serpentin adalah segar dengan lebar 10 meter dijumpai pada keratan jalan highway Gua Musang-Cameron Highland berwarna segar hijau tua-putih. Singkapan telah terich kuat. Kedudukan foliasi batuan syis-filit yang melingkupi serpentin $\text{N}340^\circ\text{E}-\text{N}350^\circ\text{E}/75^\circ$. Jasad serpentin di sini membentuk liniasi selari dengan liniasi filit-syis dan banyak merakam sesar (Rajah 2E). Hasil analisis kimia dengan metoda "XRF" daripada batuan serpentin ini menghasilkan kandungan SiO_2 ialah 40.51% (selengkapnya seperti terlihat pada Tabel 2).

2. Hasil Kajian

Batuan serpentin yang merupakan salah satu ciri sempadan antara Jalur Tengah dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia merakamkan empat kali canggaan (Tabel 1). Canggaan pertama adalah hasil daripada tegasan daripada arah utara-timurlaut. Canggaan kedua dihasilkan oleh canggaan dari arah timurlaut diikuti oleh canggaan dari timur dan akhir sekali daripada timurlaut.

Metode yang digunakan dalam analisis contoh batuan serpentin yaitu dengan XRF" dan "XRD". Metode "XRF" digunakan untuk mengetahui unsur major dan unsur surih pada masing-masing sampel batuan, sedangkan metode "XRD" dipergunakan untuk mengetahui kandungan mineral utama pada contoh batuan serpentin yang dianalisis.

Hasil analisis kimia dengan kaedah "XRF", menunjukkan bahawa batuan serpentin pada kelima contoh ini mempunyai kandungan SiO_2 antara 40.51% hingga 46.05 % Seperti yang ternampak pada Tabel 2. Sedangkan hasil analisis kimia dengan metode "XRD" yang dari kelima contoh batuan serpentin mengandungi mineral utama untuk contoh 1 kawasan Bukit Rokan Barat: lizardit. Contoh 2 kawasan mengandungi mineral antigorit. Contoh 3 kawasan Petasih mengandungi

mineral antigorit, swalerit, talk, walframit. Contoh 4 kawasan Cheroh-Bentong mengandungi mineral aktinolit, antigorit, magnesium aluminium silikat, hidromagnesit. Sedangkan contoh 5 kawasan Kelantan Barat mengandungi mineral antigorit.

Dari hasil analisis kimia dengan metode "XRF" kelima contoh batuan serpentin selanjutnya kandungan unsur majornya dimasukkan dalam program CIPW Norm (Barker,1983) seperti yang ternampak pada Tabel 3A-3E, maka untuk contoh batuan 1 kawasan Bukit Rokan Barat menghasilkan kandungan mineral: albit, akmit, diopsit, enstatit, hipersten, fosterit, olivin, magnetit, hematit, ilmenit, dan apatit. Contoh batuan 2 kawasan Kampung Selaru menghasilkan kandungan mineral: kuarza, korundum, albit, akmit, enstatit, hipersten, magnetit, ilmenit, hematit, dan kalsit. Contoh batuan 3 kawasan Petasih menghasilkan kandungan mineral: albit, akmit, diopsit, enstatit, hipersten, fosterit, olivin, magnetit, ilmenit, hematit, dan apatit. Contoh batuan 4 kawasan Cheroh-Bentong menghasilkan kandungan mineral: albit, anortit, diopsit, fosterit, olivin, ilmenit, hematit, titanit, perovskit, dan apatit. Sedangkan Contoh batuan 5 kawasan Kelantan Barat menghasilkan kandungan mineral: albit, anortit, diopsit, enstatit, hipersten, fosterit, olivin, magnetit, ilmenit dan hematit.

Analisis ini disokong dengan sayatan nipis batuan serpentin seperti pada Rajah 2A-2E, yang secara umum menunjukkan bahawa kandungan mineral pada batuan asal telah berubah menjadi serpentin pada contoh yang diambil di kawasan Bukit-Rokan Barat, Kampung Selaru, Petasih dan Kelantan Barat. Sedangkan contoh yang diambil di kawasan Cheroh-Bentong masih memeperlihatkan kenampakan mineral asalnya berupa olivine, harburgit (peridotit), serpentin, dan clinopiroksen yang menunjukkan struktur optik.

3. Pembahasan

Hasil analisis dengan metode "XRF" yang menghasilkan kandungan SiO_2 antara 40.51% hingga 46.05 % jika dibandingkan dengan model analisis unsur utama dan Norm CIPW (O.B. James, 1971) maka asalan batuan serpentin ini adalah peridotit.

Dari kenampakan karakteristik menampakan bodi singkapan berupa tabuar-lentikuler, jenis

magma tholeitik, tipe major batuan berupa harburgit, tekstur am granular dan ophitik, dan mineral utama plagioklas (albit), klinopiroksen, orto-piroksen, olivin, maka dapat diasumsikan bahawa tipe kompleks batuan igneus ofiolit.

Hal ini diperkuat dengan hasil sayatan nipis batuan serpentinit yang mengandung mineral utama olivine, harburgit (peridotit), clinopirosen dan orto-piroksin berstruktur opitik, piroksen, plagioklas (albit) dan serpentinit menunjukkan bahawa asalan batuan serpentinit adalah peridotit.

4. Kesimpulan

Batuan serpentinit pada kelima-lima lokaliti penelitian merakamkan empat kali canggaan yang merupakan sejarah canggaan antara Jalur Tengah dan Jalur Barat Semenanjung Malaysia.

Batuan serpentinit berasal dari batuan igneus ultra bes (basa) peridotit yang terbawa naik ke atas sampai permukaan selama canggaan terjadi dan membentuk ofiolit komplek di sempadan antara Jalur Tengah dengan Jalur Barat Semenanjung Malaysia.

5. Rujukan

- Barker, D.S., 1983. *Igneous Petrology*. Prentice Hall.
- Bignell, J.D. & N.J. Snelling, 1977, Geocronology of Malayan granites. *Overseas Geology and Mineral Resources* No. 47, 70 hlm.
- Hutchison, C.S., 1973. Tectonic evolution of Sundaland: a Phanerozoic synthesis. *Bull. Geol. Soc. Malaysia*,6,61-68.
- Hutchison, C.S., 1977. Granite emplacement and tectonic subdivision of Peninsular Malaysia. *Bull. Geol. Soc. Malaysia*,9,187-207.
- James, O.B. 1971 dalam Loren A. Raymond 1995, *Petrology : The study of Igneus, sedimentary, and metamorphic rocks*. USA by Wn. C. Brown Communications, inc., 742 halaman.
- Khoo, T.T. & B.K. Tan, 1983. Geological Evolution of Peninsular Malaysia. *Workshop on Stratigraphic Correlation of Thailand and Malaysia, Proc.* Vol.1, hlm. 253-290.
- Tan, B.K., 1996. 'Suture Zone' in Peninsular Malaysia and Thailand: implication for paleotectonic reconstruction of southeast Asia. *Jour. of Southeast Asian Earth Sciences*,13,243-249.
- Tjia, H.D., 1989. The Bentong Suture. *Proc. Reg. Conf. Geol. Min. Hyd. Resources of SE Asia*, Jakarta, 1987,72-75.

Pengadunan Getah Asli dengan Termoplastik: masalah dan penyelesaian

Ibrahim Abdullah

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
Bangi, Malaysia.

Abstrak

Gabungan getah asli (NR) dengan termoplastik (TP) secara kimia atau fizik telah dapat menghasilkan satu bahan komposit (TPNR) yang mempamerkan ciri kedua bahan: impak tinggi elastomer dan dapat diproseskan secara teknologi termoplastik. Umumnya NR yang terdiri daripada 99% poliisoprena adalah tidak serasi dengan TP disebabkan mikrostruktur rantai yang berbeza. Tegangan permukaan yang tinggi akan terjadi diantara dua fasa dalam adunan dan membawa kepada ketidakhomogen campuran berlaku. Bagaimanapun penyebatan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti menggunakan pengserasi kimia atau pemodifikasian kepada molekul polimer NR atau TP, mencampur agen modifikasi kelikatan kepada adunan semasa pengadunan dan memvariasi suhu serta kadar pengadunan. Modifikasi kelikatan leboran kedua komponen agar menjadi setara membolehkan pencampuran dan penghomogenan berlaku. Leboran NR, yang umumnya rendah daripada TP semasa pengadunan, dapat diubahsuai dengan penambahan agen pematang atau pengisi seperti dicumil peroksida, karbon hitam dan lain lain. Kaedah pengserasian adunan NR-Polietilena dan NR-polistirena akan dibincangkan.

1. Pendahuluan

Adunan polimer telah menjadi suatu laluan bagi menjana bahan baru yang berperestasi tinggi dan memenuhi keperluan penggunaan semasa sejak tahun 60an. Berbanding dengan kaedah kimia pengadunan menjadi pilihan disebabkan proses adalah mudah dan ringkas dalam memuatkan sesuatu sifat yang diinginkan dalam bahan baru. Sifat mekanik dan fizik bahan adalah gabungan diantara berbagai ciri daripada komponen adunan dan selalunya kesan sinergi sifat akan terhasil¹. Dengan itu dalam merekabentuk sesuatu bahan adunan komposisi dan komponen polimer menjadi perkara yang paling penting. Selain itu pemilihan adunan juga adalah berlandaskan peningkatan ciri pemprosesan dan/atau pengurangan kos.

Sifat sistem multifasa adunan adalah ditentukan oleh sifat kimia dan fizik komponen polimer, tahap interaksi antara fasa dan morfologi adunan yang terbentuk semasa pemprosesan. Interaksi antara fasa polimer ditentukan oleh

kumpulan aktif terancang atau terbentuk pada rantai polimer. Morfologi yang akan terbentuk dipengaruhi oleh sifat reologi komponen polimer, tegangan antara-muka fasa, komposisi adunan dan keadaan pemprosesan. Umumnya terdapat empat jenis morfologi terbentuk iaitu struktur zarah terserak dalam matriks, gentian-matriks, lamela dan koselanjat².

Morfologi kebanyakan adunan polimer komersial adalah berbentuk zarah dalam matriks dengan komponen minor membentuk zarah. Keadaan ini sering terdapat dalam adunan polimer diperkuat getah. Pengaruh saiz, serakan dan kepekatan zarah, interaksi permukaan fasa dan jenis getah, dan kaedah pemprosesan keatas sifat mekanik bahan telah dilaporkan dengan meluas. Morfologi koselanjat juga mendapat perhatian disebabkan struktur ini diperhatikan mampu menghasilkan gabungan sifat modulus dan hentaman komponen yang lebih berkesan. Perubahan dalam morfologi misalnya daripada matriks-zarah ke matriks koselanjat, boleh berlaku

melalui perubahan dalam kaedah pemprosesan adunan atau parameter pemprosesan seperti suhu dan kadar percampuran.

2. Elastomer Termoplastik

Elastomer termoplastik(TPE) adalah satu kelas bahan berasaskan pengadunan antara elastomer sintesis dan termoplastik. Dalam industri plastik TPE merupakan sektor yang berkembang pesat dari aspek penyelidikan dan penggunaan. Kebaikan yang paling ketara adalah pemprosesan bahan melibatkan perlatan pemprosesan plastik umum tanpa memerlukan pemvulkanan atau pemajmukan dan sebarang sisa boleh dikitar semula. Tujuan utama pengadunan elastomer dengan termoplastik adalah bagi memasukkan sifat daya tahan terhadap hentaman dan kemuluran dalam termoplastik seperti yang terjadi dalam polistirena dan polipropilena terkukuh.

Umumnya adunan TPE membentuk sistem multifasa terdiri daripada domain keras dan lembut. Pembentukan mikrodomain ini membolehkan pembentukan senibina molekul tertentu dengan sifat yang unik dan berguna untuk teknologi tertentu. Kebanyakan TPE olefin adalah adunan getah etilena-propilena (EPR) atau getah etilena-propilena-diena monomer (EPDM) dengan polipropilena (PP). Morfologi unik adunan dicapai melalui pematangan separa fasa getah dan sifat mekanik yang menarik terhasil. Pembentukan taut-silang separa dalam fasa getah diaruh oleh agen pematang yang dicampur semasa pemprosesan adunan.

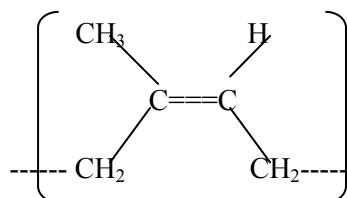
Gabungan antara getah asli dan termoplastik menghasilkan satu kelas bahan TPE dengan ciri kimia dan fiziknya lebih meluas yang dikenali sebagai getah asli termoplastik (TPNR) ³. Penyelidikan dan pembangunan TPNR bermula sejak tahun 1960an di Malaysian Rubber Producers' Research Association (MRPRA), London berasaskan kemajuan dalam adunan EPDM-PP. Keserasian adunan dan kebolehpemrosesan bahan menjadi objektif utama kajian kearah menghasilkan suatu bahan serba boleh dan mempunyai potensi penggunaan yang luas.

3. Getah Asli Termoplastik

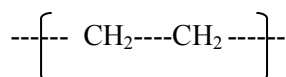
Kebanyakan kajian yang dilaporkan terfokus kepada sistem adunan NR-poliiolefin iaitu NR-Polipropilena dan NR-Polietilena (berbagai jenis PE). Walaupun tiada interaksi antara

polimer dan keserasian juga rendah, adunan menunjukkan sifat fizik dan mekanik yang memuaskan tanpa sebarang aditif. Adunan yang sempurna dan homogen akan terhasil jika terdapat interaksi dan keserasian atau tanpa sebarang ketegangan permukaan antara fasa getah dan termoplastik. Kehomogenan fasa selalunya dikaji berdasarkan perubahan nilai suhu peralihan kaca, T_g , dan pemeriksaan morfologi daripada mikrograf imbasan elektron.

Amnya interaksi permukaan akan terjadi jika mikrostruktur polimer poliisoprena dan polimer termoplastik adalah serasi dari aspek pengkutuban molekul dan kumpulan berfungsi yang akan bertindak menghalang pendekatan yang intim antara polimer. Mikrostruktur poliisoprena dan polietilena adalah;



NR (cis-poliisoprena)



PE (rantai asas)

Dalam NR ketidaktepuan ikatan karbon menjadi kumpulan berfungsi yang akan menentukan tahap interaksi dengan PE. Kehadiran rantai cabang dengan berbagai saiz dan cabang, akan menentukan penghampiran antara fasa dalam adunan. Kekuatan regangan dan modulus adunan menunjukkan tahap interaksi antara getah asli – polietilena berketumpatan rendah linear (NR-LLDPE) > getah asli - polietilena berketumpatan tinggi (NR-HDPE) > getah asli - polipropilena (NR-PP) > getah asli – polietilena berketumpatan rendah (NR-LDPE) ⁴. Keberkesanan LLDPE berinteraksi dengan NR paling tinggi adalah dirasionalkan sebagai akibat daripada rantai cabang yang minimum dan, jika wujud pun, saiznya amatlah kecil.

Adunan NR-PP merupakan sistem binari yang telah mendapat perhatian diperingkat awal dan meluas. PP dianggap pemilihan terbaik untuk diadun dengan NR berdasarkan takat lembutnya yang tinggi, $\sim 150^{\circ}\text{C}$ dan takat peralihan kaca yang rendah, $\sim -60^{\circ}\text{C}$. Dijangkakan gabungan dua polimer akan menghasilkan termoplastik serbaguna yang berpotensi diaplikasikan dalam julat suhu yang luas. Adunan berkomposisi NR melebihi 40% akan membentuk TPNR lembut, manakala yang lain akan bervariasi daripada semitegar ke tegar bergantung kepada peningkatan dalam kandungan PP.

4. Pemprosesan

Pengadunan lebor pada suhu hampir kepada takat lebor poliolefin menjadi kaedah pilihan percampuran NR-poliolefin. Saling melarut antara getah dan termoplastik akan menentukan sifat mekanik dinamik, manakala saiz fasa, daya kohesif dalam fasa getah dan lekatan antara berbagai fasa mempengaruhi sifat hentaman. Dengan itu sifat mekanik dan fizik bahan bergantung kepada tiga parameter utama: komposisi adunan, parameter pemprosesan dan agen pematangan yang di tambah. Suhu, kadar percampuran atau pengaliran dan masa pengadunan merupakan parameter pemprosesan terpenting. Secara dinamik, percampuran optimum hanya akan berlaku jika kelikatan leboran getah dan termoplastik adalah hampir setara.

Kelikatan leboran yang bergantung kepada suhu akan meningkat dengan suhu. Suhu yang rendah akan menyebabkan kesukaran jisim bergerak dan dengan itu ricihan meningkat. Akibatnya degradasi polimer akan berlaku semasa pengadunan. Kelikatan yang rendah pada suhu tinggi menyebabkan percampuran sukar berlaku. Kadar percampuran atau pengacauan dan julat masa memberi kesan keatas penyerakan fasa. Kadar dan masa pengacauan yang tinggi boleh membawa kepada degradasi polimer dan, jika terlalu rendah menyebabkan pengadunan tidak berlaku. Amnya kadar pengacauan rendah memerlukan masa yang panjang untuk menghomogenkan adunan dan sebaliknya. Bagitu juga kadar percampuran yang tinggi diperlukan pada suhu rendah. Dengan itu perhubungan diantara ketiga parameter ini: suhu, kadar dan masa, perlu ditentukan dahulu sebelum pengadunan dapat dilakukan.

Kehomogenan fasa selalunya dikaji berdasarkan nilai suhu peralihan kaca, T_g , dan pemeriksaan morfologi daripada mikrograf imbasan elektron adunan.

NR dan PE, dan NR dan PP adalah pasangan yang tidak serasi disebabkan mikrostruktur rantai polimer adalah tidak sepadan. Suatu serakan stabil zarah NR dalam matriks PP atau PE atau sebaliknya boleh terbentuk akibat daripada parameter penglarutan yang hampir sama. Parameter pengadunan lebor NR/PP adalah suhu 175 ke 185 $^{\circ}\text{C}$, kadar percampuran 40 ke 60 rpm dan julat masa 8 ke 15 minit ⁵. Adunan NR/PE boleh diadun pada suhu yang lebih rendah iaitu 135 ke 160 $^{\circ}\text{C}$ ⁶. Suhu yang tinggi akan menggalakkan pengoksidaan bahan, terutamanya NR dan sifat mekanik adunan akan menurun. Selain itu, bau tidak menyenangkan dan sifat penuaan yang rendah adalah kesan terus daripada pengoksidaan bahan.

5. Modifikasi Kelikatan

Percampuran yang sempurna akan terjadi jika kelikatan leboran komponen adalah hampir sama dan keadaan ini boleh dicapai secara meningkatkan kelikatan leboran NR atau menurunkan kelikatan leboran PP. Polimer poliisoprena adalah lebih aktif daripada PP dan dengan itu kelikatan NR lebih mudah dimanipulasi menerusi penambahan agen pematang. Taut-silang separa dalam fasa NR akan berlaku dan meningkatkan kelikatan leboran yang seterusnya meningkatkan interaksi antara fasa getah dan termoplastik. Pembentukan kopolimer graf juga akan meningkatkan interaksi antara fasa NR dan PP. Proses ini berlaku semasa pengadunan dan dikenali sebagai pengadunan reaktif atau pemvulkanan dinamik. Agen pemvulkanan separa lain adalah sulfur atau penderma sulfur pada kepekatan rendah seperti tiuram disulfida atau ditiobismorpholin (DTM), terbitan diisosiyanat dan tetrametiltiuram disulfida (TMTD).

Peroksida organik juga dilaporkan dapat meningkat sifat mekanik dan fizik adunan NR/PP dan NR/PE ⁷. Penambahan agen peroksida seperti dikumul peroksida (DCP) telah meningkatkan kekerasan, modulus, kekuatan dan keelastikan TPNR terutama dalam sistem yang kaya dengan komponen getah. Pembaikan dalam sifat mekanik menunjukkan kehomogenan dalam serakan fasa

yang tinggi akibat daripada tindakan taut-silang oleh DCP.

Kumpulan dimaleimida telah diketahui umum mampu mengaruhi taut-silang dalam elastomer dalam kehadiran peroksida, dibenzotiazol-2-il disulfida (MBTS) atau radiasi tenaga tinggi⁸. Contohnya m-fenilen bismaleimida, secara komersial dikenali HVA-2, pada kepekatan <10 phr telah dapat mengaruhi pembentukan taut-silang dengan berkesan dalam TPNR.

NR dan polistirena, yang merupakan pasangan yang amat tidak serasi akibat daripada perbezaan yang besar dalam mikrostruktur polimer membentuk dua fasa yang tidak bercampur apabila diadun. Penambahan DCP dan HVA-2 kedalam adunan mengakibatkan pengadunan menjadi lebih sempurna dan berkesan^{9,10}. Adunan NR/PS yang homogen diperolehi dan mempamerkan pertambahan dalam sifat fizik dan mekanik. Perbezaan kelikatan dan parameter penglarutan yang ketara dapat diatasi dengan pengubahsuaian kelikatan leboran komponen.

6. Pengserasian

Pengserasian melibatkan penambahan bahan aditif ke dalam adunan bagi mengurangkan tegangan antara-muka berbagai fasa dalam adunan. Umumnya aditif terdiri daripada polimer atau kopolimer yang dapat bertindak atau berinteraksi dengan komponen adunan. Sebahagian daripada polimer, satu terminal, dapat bertindak atau melarut dalam satu fasa dan sebahagian lagi dengan dalam fasa komponen yang lain. Dengan itu penolakan antara fasa akan diminimumkan dan serakan homogen fasa akan diperolehi.

Sifat fizik dan mekanik adunan NR/HDPE dilaporkan meningkat dengan pertambahan EPDM, polietilena terklorin (CPE) atau polietilena terklorosulfonat (CSPE) ke dalam adunan¹¹. Zarah terserak dengan meluas dan homogen serta saiz zarah adalah lebih kecil. Polimer aditif mempunyai mikrostruktur yang hampir sama dengan PE dan ciri keadaan amorfus hampir kepada ciri NR. Ini membolehkan polimer berinteraksi dengan fasa PE dan juga fasa NR.

Pengserasian adunan NR/LLDPE dilaporkan berkesan dengan penambahan PE terubahsuaikan seperti CPE, maleik anhidrida (PEM) dan EPDM tersulfonat (S-EPDM). Dwiblok

kopolimer, polibutadiena-b-poliisoprena terhidrogen (HB-b-PI) dan PE-b-PI, didapati meningkatkan kehomogenan adunan NR/LLDPE. Sifat mekanik meningkat dengan morfologi bertambah halus dan homogen dengan struktur koselanjat.

Pengserasian adunan NR/PP dan NR/PE (berbagai jenis) telah dibuktikan berlaku dengan penambahan getah asli cecair¹². Sifat fizik dan mekanik meningkat dengan penambahan LNR kedalam adunan. Morfologi menunjukkan saiz zarah mengecil dan taburan lebih homogen dalam adunan. Interaksi antara berbagai fasa dalam adunan dapat ditingkatkan melalui aktiviti kumpulan berfungsi yang wujud dalam poliisoprena LNR. Kumpulan aktif terbentuk hasil daripada pendegradasian pengoksidaan NR ke LNR adalah $-OH$, $-OOH$, dan $-OR$, mampu bertindak dengan rantai poliisoprena NR dan secara terhad dengan rantai PE. Berkemungkinan juga penglarutan LNR dalam NR dan interaksi fizik dan kima LNR-NR menghasilkan permukaan zarah fasa NR yang lengai dan dengan itu dapat mengurangkan tegangan permukaan antara fasa NR dan PE.

7. Penutup

Pengadunan getah asli dengan termoplastik yang tidak serasi boleh dilakukan dengan meneliti dan mengoptimumkan parameter pemrosesan. Suhu, masa dan kadar percampuran perlulah disesuaikan agar percampuran menjadi berkesan. Selain itu aturcara percampuran juga adalah penting. Kemasukan termoplastik dahulu sebelum getah asli tidak akan menghasilkan percampuran yang homogen disebabkan kelikatan tidak setara.

Kehomogenan dan morfologi adunan dapat diperbaiki melalui penambahan agen pematang dan/atau pengserasi. Agen penderma sulfur lazim, peroksida organik dan amida telah terbukti mampu mengaruhi tindak balas taut-silangan. Pengserasi terdiri daripada polimer/kopolimer yang serasi atau melarut dalam kedua komponen adunan. Amnya pematang bertindak melalui pengubahsuaian kelikatan leboran agar menjadi setara, manakala pengserasi berinteraksi dengan permukaan supaya tegangan permukaan dapat diminimumkan. Perubahan ini membolehkan komponen berinteraksi dan bercampur.

8. Rujukan

1. Hara, M. & Sauer, J.A. (1998). *J. Macrom. Chem. Phys.* C38, 327-362.
2. Utracki, L.A. (1998). *Morphology; Commercial polymer blends*. Chapman & Hall, London, UK, 98. A. Ibrahim & M. Dahlan. Thermoplastic Natural Rubber Blends. *Prog. Polym. Sci.*, 23, 665-706.
3. Ibrahim A., Sahrim A. & Che Som S. Thermal properties of NR/PP and NR/LLDPE Thermoplastic blends. *Advanced materials and Emerging new technologies*, (ed. P.N. Prasad, J.E. Mark and J.F. Tung). Plenum, New York 117-123.
4. Ibrahim A. & Sahrim A. (1992). Liquid natural rubber as a compatibilizer in the blending of natural rubber with polypropylene. *Material Forum*. 16:353-357.
5. H.M. Dahlan, M. D. Khairul Zaman & A. Ibrahim. (2000). Liquid natural rubber as a compatibiliser in NR/LLDPE blends. *App. Polym. Sci.* 78, 1776-1782.
6. Elliot, D.JK., *Kautsch. Gummi. (1986). Kunstst.* 39(7), 621.
7. Azizan A., Dahlan H. M. & Ibrahim A. (2003). Electron beam cross-linking of carbon black filled NR/LLDPE blends. *Iranian Polymer J.*, 12(5), 381-387.
8. Nor Hayati M. & Ibrahim A. (2003). Adunan getah asli/ polistirena bersama HVA-2 sebagai agen taut-silangan. *Pertanika J. Sci. & Technol.*, 11(1): 17-29.
9. Zuridah M., Ibrahim A. & Sahrim A., Effects of dicumyl peroxide and Liquid natural rubber on the physical properties of NR-Polystyrene blends. *Kautschuk Gummi Kunstst.*, 51(1), 14-18.
10. Choudhury, N. R. & Bhowmick, A. K. (1990). *J. Mater. Sci.*, 25, 161.
11. Sahrim A., Ibrahim A., Che Som S., Kohjiya S. & Yoon J. R. (1994). Natural rubber-HDPE blends with liquid natural rubber as a compatibiliser: I. Thermal and mechanical properties. *J.App. Polym. Sci.*, 51, 1357-1363.



Bencana Tsunami 26.12.2004: Maklumat Sains untuk Pendidikan dan Kesedaran Masyarakat

Ibrahim Komo, Mazlan Othman

Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI)
Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor
e-mail: komoo@pkriscc.ukm.my / mazlan@angkasa.gov.my

Abstrak

Tsunami yang melanda pantai di beberapa negara sekitar Lautan India pada 26 Disember 2004, berpunca daripada gempabumi berukuran 9.0 pada skala Richter berpusat di pantai barat Sumatra Utara, merupakan bencana alam paling dayshat pernah berlaku pada abad ini. Beberapa negara, terutamanya Malaysia dan Thailand, tidak pernah menduga bahawa tsunami boleh melanda perairan mereka. Angka kematian akibat bencana ini sehingga 12 Februari dilaporkan berjumlah 285,995 orang, di Malaysia jumlahnya ialah 68 kematian, menjadikannya angka kematian terbesar dalam sejarah bencana tabii di negara ini. Walaupun manusia tidak dapat menghindarkan sepenuhnya bencana alam, tetapi usaha untuk meminimumkan impak terhadap kematian dan kemusnahan harta boleh dilakukan jika pengetahuan saintifik mengenai punca, cirian dan kelakuan bencana diselidiki dan digunakan untuk formulasi dasar dan perancangan pembangunan masyarakat. Bencana tsunami 26.12.2004 telah memberikan banyak pengajaran, khususnya di Malaysia bahawa maklumat sains sedia ada tidak mampu dimanfaatkan sepenuhnya untuk kesejahteraan masyarakat. Kertas ini akan menghuraikan pelbagai isu berkaitan pendidikan dan kesedaran masyarakat yang terjelma berasaskan impak tragedi ini.

Kata kunci: Bencana Tsunami, Kesedaran Awam, Pendidikan Masyarakat

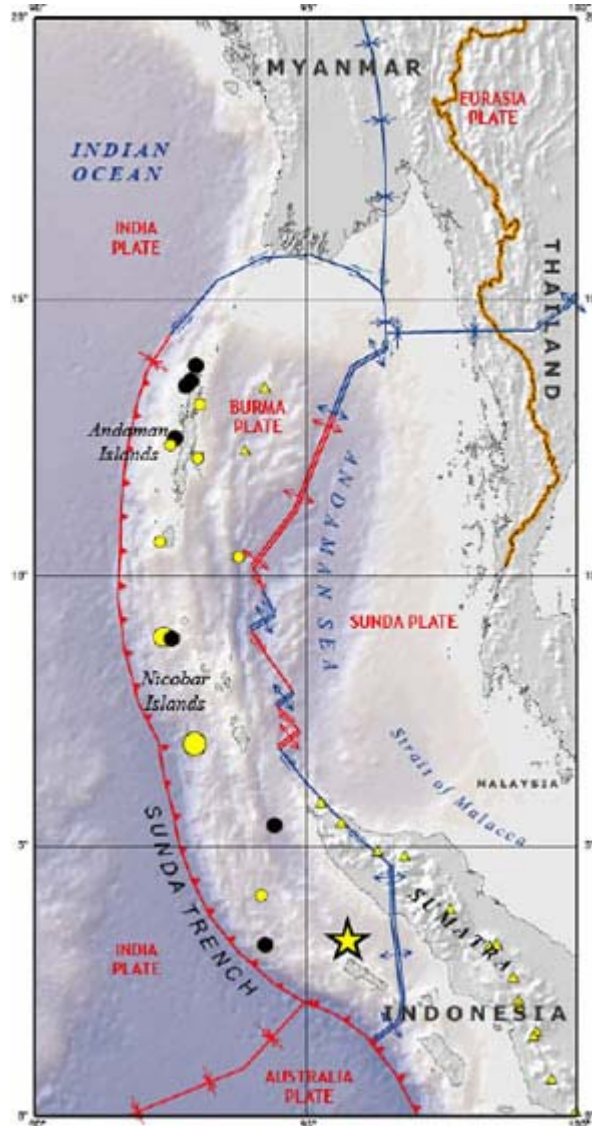
1. Pendahuluan

Bencana tsunami yang melanda sejumlah negara persisiran di rantau Lautan India berpunca daripada gempabumi berukuran 9.0 pada skala Richter, epipusat di pantai barat Sumatra Utara dan menghasilkan zon pecahan sepanjang lebih 1300 km. Tragedi ini merupakan bencana alam yang paling besar pada abad ini dan telah meragut lebih daripada 285,995 nyawa dan memusnahkan harta serta kemudahan awam. Banyak isu yang boleh dipelajari oleh negara-negara pesisir Lautan India daripada bencana ini, antaranya ialah sistem pertahanan, sistem amaran awal, sistem bantuan mangsa, dan strategi pembinaan semula pasca-bencana. Semua tindakan ini memerlukan pelbagai input teknikal dan bukan teknikal yang berasaskan maklumat saintifik. Pengajaran yang paling penting ialah sejauhmana pendidikan dan kesedaran awam

telah dipertingkatkan bagi menghadapi bencana secara jangka pendek dan jangka panjang.

2. Bencana Tsunami 26.12.2004

Gempabumi berukuran 9.0 pada skala Richter yang berlaku di pantai barat Sumatera Utara (LAT 3.298° dan LON 95.779°) pada 00:58:51 masa-UTC dipercayai telah menyebabkan bencana tsunami yang melanda Indonesia, Sri Lanka, India, Maldives, Thailand, Malaysia, Bangladesh, Somalia dan Seychelles. Selepas gempabumi besar tersebut, terdapat 15 lagi gempabumi susulan di kawasan sekitar kepulauan Andaman, kepulauan Nicobar dan pantai barat Sumatera Utara, berukuran antara 5.7 hingga 7.3 pada skala Richter dalam 12 jam berikutnya (Rajah 1) dan ratusan lagi gempabumi susulan untuk beberapa minggu berikutnya.



Rajah 1 : Kedudukan gempabumi 26.12.2004 yang berukuran 9 pada skala Richter dan gempa bumi susulan 12 jam berikutnya (USGS, 2005)

Gempabumi dan Pecahan Kepingan

Maklumat mengenai gempabumi 26.12.2004 dan mekanisme pecahan kepingan telah dijelaskan oleh US Geological Survey (2005). Gempabumi berkedalaman cetek jenis sungkupan berlaku sepanjang sempadan antara kepingan India dan kepingan Burma apabila tenaga keterikan dibebaskan secara serta merta akibat pecahan (patahan) kepingan. Tenaga keterikan yang tinggi telah terkumpul sepanjang sempadan kepingan ini disebabkan kepingan India bergerak ke arah timurlaut pada kadar sekitar 5 cm per tahun menyusuk ke bawah kepingan Burma. Tenaga keterikan yang dibebaskan dipercayai berpunca daripada gelinciran (sesaran) sepanjang lebih 1200 km sempadan kepingan dari utara Sumatera (3°

Utara) hingga Pulau Andaman (14° Utara). Ini ditunjukkan oleh kedudukan dan taburan gempabumi susulan (*aftershocks*) yang telah direkodkan selepas berlakunya gempabumi utama.

Kebanyakan gempabumi berskala besar berlaku disebabkan mega-sungkupan (*megathrust*) di sepanjang kepingan lautan yang menyusuk masuk ke bawah kepingan benua. Antaranya yang terbesar ialah: magnitud 9.5 1960 gempabumi Chile; magnitud 9.2 1964 gempabumi Prince William Sound, Alaska; magnitud 9.1 1957 gempabumi Andreanof, Alaska; dan magnitud 9.0 1852 gempabumi Kamchatka. Gempabumi utara Sumatera yang bermagnitud 9.0 ini merupakan gempabumi ke-5 terbesar pernah direkodkan dalam 100 tahun

terakhir ini, dan ditafsirkan telah menyebabkan pecahan (rupture) sepanjang satah gelinciran lebih 1200 km panjang, lebih 100 km lebar dan dengan anjakan sekitar 15 m (USGS 2005a). Mega-sungkupan ini telah menyebabkan permukaan batuan di dasar laut pada zon pecahan terangkat beberapa meter yang menjadi punca kepada pembentukan tsunami.

Tsunami dan Impaknya

Akibat daripada pengangkatan serta merta permukaan batuan di dasar laut pada zon pecahan, badan air lautan teranjak ke atas lalu membentuk gelombang seismos laut (*seismic sea waves*) atau lebih dikenali sebagai 'tsunami'. Tidak seperti kebanyakan tsunami sebelum ini yang berpunca daripada pusat gempabumi, tsunami 26.12.04 berpunca daripada garisan pecahan sepanjang lebih 1200 km, umumnya bergerak dalam bentuk elip dengan tenaganya yang lebih tinggi bergerak ke arah timur-barat (Rajah 2). Di lautan dalam tsunami bergerak dengan kelajuan antara 500 – 800 km per jam, sampai ke persisiran Sri Lanka dan India sekitar 2 jam; Australia 5 jam; Madagascar 8 jam; dan persisiran Antarctica. Semakin jauh dari puncanya, tenaga tsunami beransur berkurangan walaupun tsunami kali ini boleh dirasai di seluruh Dunia.

Di persisiran Sumatera Utara kerana jaraknya kurang daripada 300 km dari punca gempabumi, tsunami melanda dalam masa yang singkat dan bertenaga sangat tinggi telah menyebabkan bencana alam yang luarbiasa. Sehingga Februari 12, 2005, sekurang-kurangnya 232,732 orang telah terkorban akibat tsunami (sebahagian kecil gempabumi) di Indonesia. Di Thailand tsunami melanda persisiran Phuket dan kawasan sekitarnya kira-kira 2 jam selepas gempabumi, akibatnya seramai 5,393 orang terkorban yang kebanyakannya sedang bercuti atau beriadah di kawasan pantai.

Di Malaysia tsunami melanda persisiran pantai barat Semenanjung Malaysia, i.e. di Kedah khususnya di Kepulauan Langkawi dan Kota Kuala Muda, di Pulau Pinang dan persisiran Perak dan Selangor. Kita bernasib baik kerana lautan Selat Melaka yang cetek telah banyak memperlambatkan halaju ombak serta mengurangkan tenaga rempuhannya. Tsunami melanda Kepulauan Langkawi sekitar 12.40 waktu tempatan (lebih 3 jam selepas gempabumi) dan tiba di Pulau Pinang dan Kota

Kuala Muda hampir satu jam kemudiannya. Akibat daripada landaan ini 68 orang terkorban dengan kerosakan pelbagai harta benda awam dan persendirian.

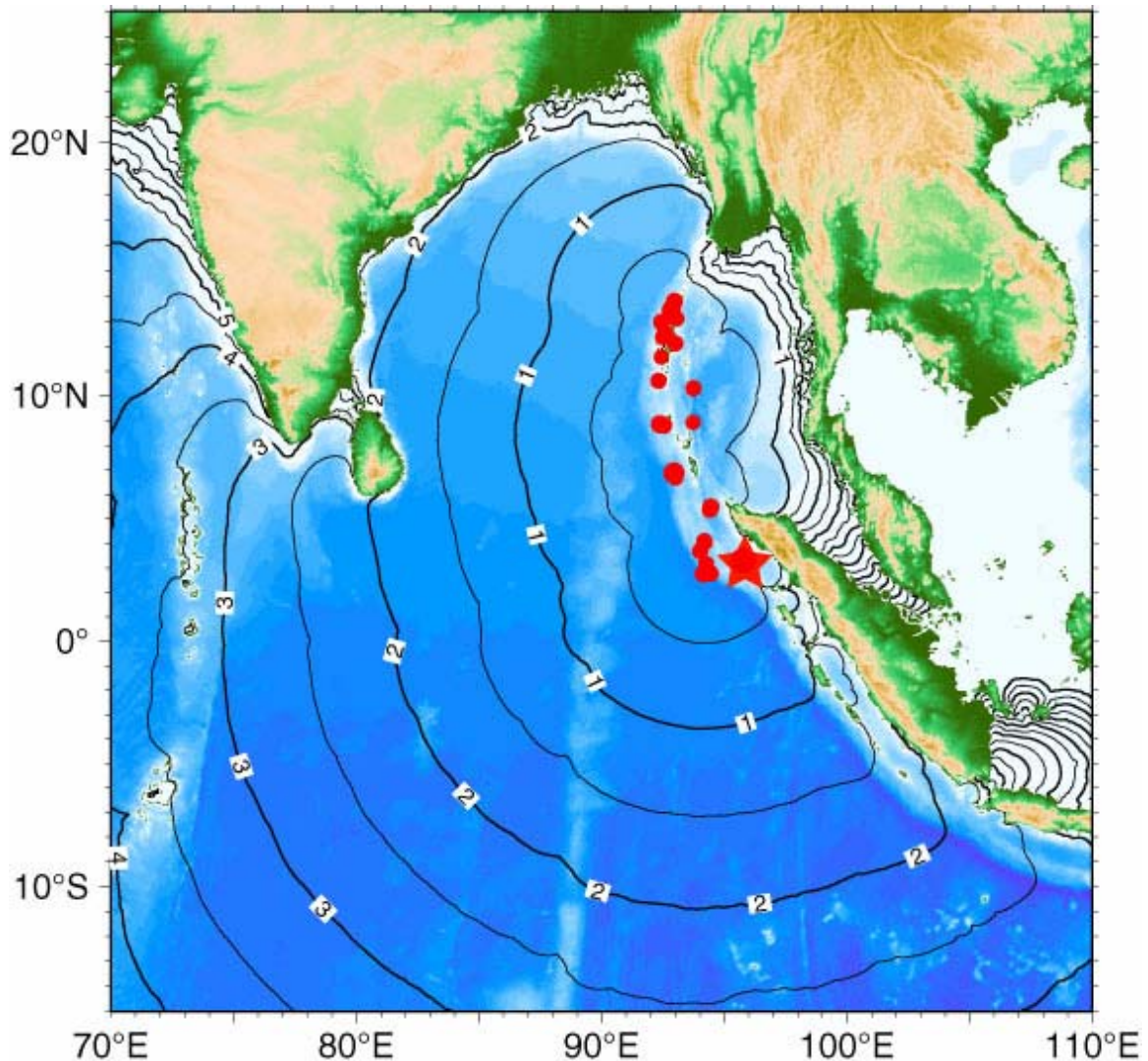
3. Maklumat Sainifik Global

Salah satu isu pokok yang diutarakan oleh pelbagai pihak mengenai peristiwa tsunami ini ialah mengapa tiada 'sistem amaran awal' dikeluarkan bagi membolehkan sebahagian daripada mangsa terselamat daripada malapetaka ini? Hakikatnya, walaupun *the Pacific Warning Center* di Hawaii ada melaporkan kemungkinan berlaku tsunami 15 dan 65 minit selepas kejadian gempabumi, maklumat ini tidak dapat dikomunikasikan ke rantau Lautan India. Antara sebab utama ialah masih belum tersedia rangkaian sistem amaran awal tsunami di rantau ini. Seorang pegawai daripada *USGS National Earthquake Information Center*, Waverly Person, melalui laman-webnya (USGS 2005b) menyatakan:

"most of those people could have been saved if they had had a tsunami warning system in place or tide gauges", dan beliau juga menambah "because large tsunami or seismic sea waves are extremely rare in the Indian Ocean, people were never thought to flee inland after they felt the tremors of an earthquake."

Maklumat saintifik mengenai gempabumi dan tsunami 26.12.04 telah tersebar dengan pantas dan meluas sebaik sahaja bencana ini berlaku. Hanya beberapa minggu selepas bencana ini, pelbagai aspek saintifik – penjelasan, teori, model dan animasi tsunami telah diedarkan oleh beberapa agensi kerajaan dan pertubuhan bukan kerajaan melalui laman-web masing-masing. *US Geological Survey* merupakan agensi kerajaan paling aktif menerbitkan pelbagai aspek saintifik mengenai peristiwa ini dengan kemaskini maklumatnya hampir setiap minggu. Mereka telah memberikan tumpuan terhadap penyampaian maklumat yang relevan kepada masyarakat secara bersistem dan bijaksana.

Kenyatan Person seperti catatan di atas penting dikupas dengan lebih mendalam. Dari satu aspek beliau menyatakan banyak nyawa boleh diselamatkan, tetapi pada nada yang berbeza, beliau menyatakan masyarakat mungkin tidak akan mengambil tindakan menyelamatkan diri



Rajah 2 : Peta menunjukkan masa pergerakan tsunami 26.12.2004 di kawasan sekitarnya (NIAIST, 2005)

kerana peristiwa seumpama ini amat langka dan belum pernah mereka alami. Hal yang sama boleh dilanjutkan mengenai kepentingan maklumat saintifik ‘gempabumi dan tsunami’ untuk faedah masyarakat. Walaupun maklumat yang tersedia banyak dan meluas, pengetahuan ini masih sukar diterjemahkan untuk faedah masyarakat di beberapa negara Asia Tenggara, khususnya di Malaysia kerana beberapa kekangan berikut:

- anggapan bahawa negara bebas dari ancaman bencana tabii, khususnya gempabumi dan tsunami, menyebabkan pengetahuan saintifik mengenai hal ini kurang relevan dan jarang diambilkira dalam perancangan negara;

- kurang kepakaran tempatan yang menerokai pengetahuan mengenai bencana tabii sehingga maklumat tidak terkumpul secara bersistem dan sebarannya kepada masyarakat sangat terbatas; dan
- kelangkaan kejadian bencana tabii menyebabkan masyarakat tiada atau kurang berpengalaman mengharunginya dan tidak mampu menerima hakikat bahawa mereka boleh terimpak oleh bencana sedemikian.

Bencana gempabumi dan tsunami 26.12.04 diharap dapat memberikan pengajaran baru kepada masyarakat di beberapa negara Asia, terutamanya masyarakat Malaysia bahawa bencana alam berskala besar umumnya bersifat

rantauan atau global, dan tiada negara yang bebas daripada ancamannya.

4. Maklumat Saintifik Tempatan

Maklumat saintifik tempatan mengenai gempabumi dan tsunami sangat terbatas atau boleh dikatakan hampir tiada. Satu-satunya jabatan yang diberikan mandat untuk merekod gempabumi ialah Jabatan Kajiucua Malaysia. Jabatan ini mempunyai sejumlah seismogram yang ditempatkan di Semenanjung Malaysia, Sabah dan Sarawak bertujuan untuk merekodkan peristiwa gempabumi sebagai sebahagian daripada jaringan gempabumi global. Maklumat yang terkumpul jarang digunakan atau disebarkan kepada masyarakat awam kerana dianggap tidak relevan untuk kegunaan tempatan.

Di institusi penyelidikan dan pusat pengajian tinggi, Malaysia tidak memiliki pakar yang telah atau sedang menjana maklumat saintifik mengenai gempabumi (termasuk tsunami). Apabila bencana tsunami melanda negara baru-baru ini, beberapa pakar Sains Bumi (bidang yang paling hampir untuk menghuraikan fenomena gempabumi dan impak bencananya) telah dijemput oleh pihak kerajaan dan media massa untuk menjelaskan aspek saintifik bencana ini. Mujurlah maklumat saintifik global yang tersebar melalui laman-web cukup banyak dan menyeluruh bagi membolehkan maklumat ini diolah semula dan digunakan untuk disampaikan kepada masyarakat awam. Selepas bencana, beberapa pihak telah menjalankan pelbagai kajian impak, antaranya kumpulan yang diketuai oleh LESTARI (2005) yang kini sedang meninjau impak alam sekitar dan sosio-ekonomi di kawasan yang terlibat.

Media massa tempatan kurang menyebarkan maklumat saintifik mengenai gempabumi dan bencana tsunami untuk perhatian masyarakat awam. Ini berpunca daripada beberapa kemungkinan berikut, antaranya:

- maklumat saintifik tempatan terbatas dan jika adapun masih belum berjaya diolah untuk maklumat awam;
- kefahaman yang rendah di kalangan pelbagai pihak berkepentingan mengenai tsunami, terutama media massa tidak membolehkan mereka mengolah maklumat saintifik sedia ada (global atau

tempatan) secara tersendiri sebagai maklumat awam atau bahan berita;

- kesedaran masyarakat yang rendah terhadap hubungkait antara maklumat saintifik dan bencana menyebabkan tuntutan untuk memperolehi maklumat saintifik yang tepat, menyeluruh dan pantas kurang mendasak;
- bencana lebih mudah dikaitkan dengan penderitaan masyarakat, tindakan pihak berkepentingan untuk mengatasi isu pasca-bencana serta aktiviti memberikan bantuan kemanusiaan menyebabkan kebanyakan berita tertumpu kepada aspek ini; dan
- aspek komersial media massa menuntut ruangan yang lebih terhadap isu-isu sensasi, hiburan, politik dan perniagaan menyebabkan tumpuan yang rendah diberikan kepada aspek pendidikan masyarakat.

Keperluan maklumat saintifik untuk menangani isu bencana alam merupakan suatu aspek yang mendesak terutamanya pengurusan bencana yang melibatkan amaran awal atau aktiviti penghindaran bencana. Usaha huluan (pra-bencana), terutamanya yang melibatkan pengenalanpastian cirian bencana, pemetaan risiko bencana, ramalan impak bencana dan pembangunan teknologi kawalan memerlukan pengetahuan saintifik yang mendalam. Hubungan antara amaran awal dan keperluan maklumat saintifik ini telah dihuraikan dalam ISDR (2004).

Jika ditinjau secara lebih dekat wujud perhubungan yang erat antara pihak media massa, masyarakat awam dan para saintis tempatan mengenai kurangnya pemanfaatan maklumat saintifik untuk menghindar bencana alam. Hubungkait ini boleh dijelaskan berasaskan cirian tradisi dan pendekatan pendidikan dan kesedaran awam.

5. Pendidikan Awam

Pendidikan awam, khususnya pendidikan formal di Malaysia telah diwarisi melalui pendidikan yang diperkenalkan oleh kerajaan Inggeris. Tumpuan telah diberikan kepada pendidikan untuk meningkatkan kemahiran bagi mewujudkan tenaga manusia yang mampu menjalankan tugas harian untuk pelbagai sektor pembangunan negara. Oleh itu, tumpuan telah diberikan kepada pembangunan sektoral yang

berkaitan dengan aspek teknikal dan ikhtisas. Masyarakat Malaysia kurang terdedah dengan pengetahuan sains alami, sains dalam hidupan harian dan sains untuk kesejahteraan masyarakat.

Walaupun banyak institusi penyelidikan dan pusat pendidikan tinggi menjalankan penyelidikan dan pembangunan, tumpuan telah diberikan kepada penyelidikan yang bersifatgunaan dan berorientasi penghasilan produk. Penyelidikan fundamental dan penerokaan dan pengembangan ilmu sangat terbatas, jika ada, hanyalah atas minat dan inisiatif individu atau kelompok kecil yang mempunyai kecintaan yang mendalam untuk meneroka bidang ilmu kepakaran masing-masing.

Dalam keadaan begini, di Malaysia penerokaan pengetahuan mengenai bencana alam, i.e. gempabumi (termasuk tsunami), letusan gunung berapi, gelinciran tanah, pencemaran alam sekitar dan banjir, berkembang secara berlahan dan masih terkongkong dalam dunia akademik sahaja. Belum ada usaha yang menyeluruh untuk menterjemahkan pengetahuan ini untuk dijadikan sebahagian daripada kurikulum pendidikan formal di sekolah dan pusat pengajian tinggi sebagai bahan pendidikan awam.

Lanjutan daripada situasi yang dinyatakan di atas, pendidikan tidak formal turut mengikuti aliran pendidikan formal. Tidak banyak maklumat saintifik mengenai bencana alam dikeluarkan oleh agensi kerajaan, media massa dan pertubuhan bukan kerajaan tempatan. Masyarakat Malaysia lebih terdedah kepada maklumat saintifik mengenai bencana alam yang berlaku di luar negara (bersifat global) melalui media massa asing atau pelbagai bentuk penerbitan (majalah dan buku) untuk pengetahuan awam.

Perkara yang perlu diberikan perhatian utama ialah keseluruhan jaringan amaran awal bencana yang meliputi pengurusan risiko bencana, kesediaan menghadapi bencana, pengurangan *vulnerability*, bantuan pasca-bencana, dan pembinaan semula. Semua perkara ini melibatkan keupayaan semua pihak berkepentingan, termasuk masyarakat awam, mengenai aspek saintifik bencana, i.e. punca bencana dan keupayaannya, mekanisme dan kelakuannya, saiz dan jangkauan, kekerapan,

tanda-tanda awal kejadian, dan pendekatan ramalan.

Untuk membolehkan maklumat ini diterapkan di semua peringkat masyarakat dan pentadbiran awam, semua bentuk pendidikan, sama ada bersifat formal atau tidak formal perlu memberikan perhatian mengenai isu bencana alam dan langkah penghindarannya. Pada peringkat sekolah dan institusi pendidikan tinggi, aspek bencana boleh dijadikan sebahagian daripada kurikulum dan ko-kurikulum bagi memastikan isu amaran awal dan tindakan penghindaran menjadi agenda utama dalam pemikiran masyarakat dan strategi asas dalam dasar pembangunan negara.

Oleh kerana pembangunan pengetahuan saintifik dan penterjemahan maklumat ini kepada dasar, sistem pengurusan dan pembangunan teknologi merupakan isu yang rumit dan memerlukan komitmen yang tinggi, setiap negara perlu mewujudkan agensi atau institusi khusus mengenai R&D dan pengurusan bencana. Agensi seumpama ini boleh diberikan mandat untuk mengembangkan pelbagai aspek saintifik untuk membangun dasar mengenai bencana, sistem amaran awal, sistem pengurusan bencana, sistem ramalan, sistem komunikasi dan aspek pendidikan serta kesedaran awam.

6. Kesedaran Awam

Sebelum bencana Tsunami 26.12.04, tidak ramai masyarakat Malaysia yang mengetahui apa itu tsunami? Kini, selepas beberapa minggu tragedi ini melanda hampir keseluruhan negara di perairan Lautan India, sebahagian besar masyarakat Malaysia termaklum dan mulai membincangkan bencana ini secara meluas di semua peringkat masyarakat. Peristiwa bencana ini, sekurang-kurangnya telah berjaya menarik minat awam mengenai peristiwa bencana, khususnya bencana gempabumi dan tsunami. Peristiwa bencana, kecil atau besar, perlu dijadikan pemangkin untuk meningkatkan kesedaran awam mengenai hal-ehwal bencana dan pendekatan pengurusannya.

Membina kesedaran awam mengenai peri pentingnya mengurus dan menghindar bencana bukannya suatu perkara yang mudah. Ini perlu dilakukan secara berstrategi dan berterusan. Beberapa aspek kesedaran awam yang berkaitan dengan bencana tsunami boleh diringkaskan seperti berikut:

- suatu peristiwa saintifik (i.e. bencana tsunami) boleh menjadi sangat popular apabila ia melibatkan masyarakat tempatan dan dipelopori oleh media massa. Dalam hal ini, media masa boleh dan mampu memainkan peranan penting bagi meningkatkan kesedaran awam mengenai isu yang berkaitan dengan maklumat saintifik, walaupun dalam keadaan biasa pengetahuan saintifik membosankan masyarakat;
- survei secara rambang mendapati, kebanyakan maklumat mengenai bencana diperolehi oleh masyarakat awam melalui siaran tv, dan bukannya dari bahan media bercetak (majalah dan akhbar). Peningkatan peratusan masyarakat yang suka membaca masih lagi rendah di kalangan masyarakat Malaysia, lebih-lebih lagi bahan bermaklumat saintifik;
- masyarakat menunjukkan minat maklumat saintifik mengenai bencana tsunami yang tinggi tetapi mengharapkan ia dipaparkan dengan cara yang termudah. Oleh itu, pelbagai strategi pembangunan kesedaran awam perlu dipelopori, antaranya menerusi pameran, filem dokumentari, sebaran fakta dan maklumat asas oleh agensi berkepentingan dan menerusi kempen penghindaran risiko bencana.

Kesedaran awam merupakan asas dalam proses pengurusan dan penghindaran bencana alam. Masyarakat awam yang menyedari dan berpengetahuan mengenai risiko bencana akan mengambil tindakan susulan yang lebih berkesan untuk menghindar atau meminimumkan impak bencana tersebut. Secara jangka panjang, tindakan masyarakat awam inilah yang akan terjelma dalam dasar dan pelaksanaan agensi kerajaan untuk mengurus bencana secara jangka panjang.

7. Kenyataan Penutup

Pendidikan dan kesedaran awam merupakan asas bagi sebuah negara untuk menghadapi bencana alam. Dalam kebanyakan kes bencana,

kehilangan nyawa dan kerosakan harta benda yang besar umumnya berpunca daripada kurangnya kesedaran awam mengenai risiko yang mereka hadap akibat sesuatu bencana alam. Oleh kerana bencana bukannya suatu perkara harian, usaha yang gigih perlu diwujudkan untuk meningkatkan pendidikan dan kesedaran awam. Untuk ini, pembangunan maklumat saintifik dan pendekatan sebaran yang berkesan kepada masyarakat seharusnya menjadi agenda utama untuk mengurangkan impak bencana alam terhadap masyarakat dan negara.

8. Ucapan Terimakasih

Sebahagian daripada maklumat yang terkandung dalam kertas ini merupakan hasil perbincangan dalam Dialog Meja Bulat mengenai Tsunami 26.12.04 yang diadakan di Institusi Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI), UKM pada 20 Januari 2005. Penghargaan yang tinggi diberikan kepada semua yang terlibat.

9. Daftar Pustaka

- ISDR (2004). Early Warning as a Matter of Policy – The Conclusions of the Second International Conference on Early Warning. International Strategy for Disaster Reduction, Bonn, Germany, 28pp.
- LESTARI (2005). Bencana Tsunami 26.12.04 di Malaysia: Kajian Impak Alam Sekitar dan Sosio-ekonomi. Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI), UKM (laporan sedang disediakan).
- Terradaily – News About Planet Earth (2005). Death toll in Asian tsunami disaster at 285,993. (<http://www.spacedaily.com/>)
- USGS (2005a). Tectonic Summary: Magnitude 9.0 Earthquake off the West Coast of Northern Sumatra. Preliminary Earthquake Report (<http://earthquake.usgs.gov/eqinthenews/2004/usslav/>)
- USGS (2005b). Warning Could Have Saved Thousands in Asia – 26 December, 2004 (<http://iri.columbia.edu/lareef/tsunami/>)

Effect of food plants on the development, reproduction and feeding behavior of *Spodoptera exigua* L. and *Plutella xylostella* L.

Idris, A.B., Selvi, C., Emelia. O. and Leong, C.K.

School of Environmental and Natural Resource Sciences
Faculty Sciences and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
idrisgh@ukm.my

Abstract

Studies on the effect of several Brassica and non-Brassica plants on the development, reproduction and feeding behavior of Spodoptera exigua (beet armyworm, BAW) and Plutella xylostella (DBM) were conducted in the laboratory and greenhouse. Results showed that the reproduction, developmental rate (larva and pupa), feeding behavior (time taken to reach the food sources, total time spent on food and time leaving in choice and non-choice tests) were varied with plants offered. Brinjal was extremely suppressed BAW larval development and growth. Significant correlation ($r = 0.96$) was observed between the total weight of fecal produced and its development time, indicating the low digestible food would prolong larval and pupal development time of BAW. Shorter DBM larval and pupal developmental time was observed when larvae were fed B. juncea and B. oleracea (cultivated) than on the B. alba and B. juncea (cultivated), and B. juncea and C. rutidosperma (wild). BAW larvae were found to only choose okra, onion and chilli, and not on tomato or brinjal in choice experiment. However, in no-choice experiment, BAW larvae were observed to reach and staying on the brinjal and tomato. The feeding time spent by DBM larvae was significantly longer on the cultivated than on the wild food plants except in a choice experiment. However, in a no-choice experiment, DBM larvae took significantly shorter time to reach C. rutidosperma and B. juncea var. rugose than the other food plants. Variability in responses to food offered in relation to the absent or present in various concentrations of chemicals (eg. glucosinolates, sinalbin, terpenoid, djenkolic acid, E – B – fenesen, other glycosides and other olfactory chemicals) in each plant tested are discussed.

1. Introduction

The diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae) has been the major insect pest of cabbage (Brassicaceae) and other crucifer crops worldwide (Talekar & Shelton 1993) and lately the beet armyworm (BAW), *Spodoptera exigua* L. (Lep.: Noctuidae) is becoming another main insects pests of cabbages. In Malaysia, unlike DBM which was introduced from Mediterranean, BAW has not been recorded until the end of 1995 where heavy infestation of *S. exigua* on cabbages and chilli in Johor (Ahmad & Ho, 1980). Generally, DBM and BAW could cause extensive damage to the economic crops such as cabbages. The damages caused by either one or in combination of these two pests are always

severe, which most of the time total yield lost due to unmarketable produces (Sivapragasam et al., 1994). DBM can be found on many Brassicaceae plants and certain non-host plants that contain mustard oils (glucosinolates) (Gupta & Thorsteinson, 1960) while *S. exigua* was known to infest a wider range of plant species other than brassicas that make it more difficult to control compared to DBM.

DBM is one of a few insect pest species that has developed resistance to all pesticides including *Bacillus thuringiensis*. Similarly, BAW control method using insecticides was surprisingly ineffective even in the first round of spray and that the have developed resistant to almost all insecticides used against it. As

such an alternative ways to control DBM and BAW and one of those is cultural methods, which includes planting other crops or plants that might have negative effects on the pests. The presence of different types and concentration of glucosinolates found in brassicas and some non-brassicas such as peas, which act as feeding attractants or stimulants, between host plants had been identified by Cole (1976). The possible impact of *Brassica vulgaris* R. BR. and *Brassica kaber* D.C. Wheeler on resistance management of DBM in Michigan, USA, was reported by Idris & Grafius (1996). In India, the Indian mustard (*Brassica juncea* (L.)(Czen.), has been used successfully as a trap crop for controlling DBM (Srinivasan & Krishna Moorthy, 1991).

This study was aimed to investigate the effect of different food plants on the development, reproductive and feeding behavior of *P. xylostea* and *S. exigua*. Information derived from this study could be used in an integrated management of DBM and BAW, as certain crops that are highly preferred or non-preferred by the DBM or BAW could be interplanted with crop that have negative impact on the pest population. It is expected that crops in a mix cropping system are less preferred or have negative effect on DBM and *S. exigua*.

2. Experimental

Source of Insect and Plants. *Spodoptera exigua* eggs were taken from Malaysia Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Serdang, Selangor. First generation of UPM-resistant strain DBM donated by Malaysian Research Development Institute (MARDI) was used for the study. Insects were fed artificial diets provided by MARDI. In *S. exigua* study, five types of food plants were used namely chilli (*Capsicum annum* : *Capsumae*), tomato (*Lycopersicon esculentum* : Solanaceae), okra (*Abelmoschus esculentus*: Malvaceae), onion (*Allium sativum*: Alliaceae) and brinjal (*Solanum melongena*: Solanaceae). For DBM study, four cultivated *Brassica* (*Brassica juncea* Cosson, *B. alba* Rebenh, *B. juncea* Coss.var. *Rugose* Bally, *B. oleracea* var. *alboglabra* (Bally), one wild *Brassica* (*B. juncea* L. (Czern)(Indian Mustard), and one Capparidaceae, *Cleome rutidosperma* D.C., were used as DBM food plants. These food plants were raised in clay

pots in the greenhouse one-month prior to experiment.

Development time of larva, pupa and egg production. Hundred *S. exigua* eggs were placed on each food plants previously placed in a plastic container (20.5 x 47.0 x 6 cm³) with wetted filter paper on its bottom. Number of eggs hatched was recorded daily until no more hatches. Larvae were reared and fed different food plant until pupation. Number of pupae formed was recorded, collected and kept in oviposition cages for adult emergence, mating and oviposition; the oviposition cage consisted of a cylindrical plastic bottle, 30 cm diameter x 50 cm height, internally lined with white paper used as oviposition site, an upper part of the cage was covered with netting cloth, cotton wetted with 10% sucrose solution was put on the upper part of the cage as food source and cages were lighted for 12 hours set up 40 cm above it. Number of adults emerged and eggs laid were recorded daily until no more eggs were observed. Experiment was arranged following the randomized complete design and replicated three times per treatment.

Hundreds *S. exigua* and DBM eggs were placed on each food plants, respectively, previously placed in a plastic container as above with wetted filter paper on its bottom. Ten newly hatched larvae were kept individually in a 15 cm diameter petri dishes containing a piece of respective food plant (4 cm²). A moistened filter paper was lined in the bottom part of petri dishes. Both leaves and the filter papers were changed daily. Larva feecal was collected daily and weighted at the end of larval period. Pupae developmental time was also recorded daily until adult emergence. The treatments (food plants, five replicates per treatment) were arranged following a complete randomized design, and placed in a growth chamber at 25 ± 2°C, 12:12 h (L:D) photoperiod and 50% R.H. until adult emergence. Treatments were checked daily to record the larval and pupal developmental times. Pupae were weighed when its color had changed from light green to brownish or 1-2 d before adult emergence. The emerged adults were kept temporarily for 2 - 3 days in refrigerator (5°C) before used in a subsequent experiment.

In DBM study, a modified 500 ml plastic container, screen lid on top (4 x 5 cm) and on the sides (3 x 3 cm), was used as an oviposition

cage. A pair of DBM adults were released in each cage placed under white light (CROMPTON^R, 160 Watt, and 80 cm above the top cage with light intensity range between 430 - 500 lux) for 2 d, after which the male were taken out, to ensure mating occurred. A 15 ml test tube (3 x 6 cm) filled with 10% (v/v) diluted honey was placed inside the cage to feed the DBM adults. A single aluminum (Al) foil, 2.5 x 4 cm, with strips on both sides made using forceps, coated with juice of cabbage leaves was put in a cage through a cut made on the lid to serve as an oviposition substrate. Treatments were replicated four times, arranged following a randomized complete block, and kept at room temperature and R.H. Numbers of egg were recorded at 0700 h daily, the same time an Al foil was also replaced, until there were no eggs laid.

Feeding Behavior. Choice and no-choice tests were used to study feeding behavior of BAW and DBM larvae on different food plants. In both tests, a modified 15 cm diam Petri dish (four-screen lid, 1 cm diam, were made on the cover for better ventilation) following Idris & Graffius (1996) was used. In a no-choice test, five pieces of leaf (2 cm² each) of a food plant species were placed inside of each Petri dish where distance between leaf cut was 7 cm with 1cm and 4.5 cm from edge and center of petri dish respectively. One third instar BAW or DBM larva, starved for 6 h and 12 h respectively, was released in the center of a dish. In a choice test, four pieces of leaf (similar size as for no-choice test and each leaf piece represent a plant species) per replicate were placed inside the Petri dishes and arranged as for no-choice test except the distance between leaf pieces was 5 cm. In both tests, treatments were placed 80 cm below the white light as mentioned above, and kept at room temperature and R.H. Times taken by larva to reach food (leaf piece) from the point of release (center of dish), and times spent for feeding within 3 hours observation (from 0900-1200 and 1400 - 1700 h for BAW and DBM respectively) were recorded using a tape recorder. Parameters of feeding behavior recorded were time taken by the larvae to reach, staying on, feeding and leaving the food. Experiment was arranged following the randomized complete design with eight replicates per treatments. The same methods used in choice experiment were employed in

no-choice experiment, and similarly to parameters were recorded. However, in this study, only one plant species were placed in the petri dish.

Data Analysis. Data were analyzed using the SAS System program version 6.12. The development time of larvae, and pupae per treatments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Simple correlation analysis was also conducted to find the relationship between total fecal weight produced per larva per treatment and larval and pupal development time. One-way ANOVA was also used to analyze data of feeding behavior (times taken by larva to reach food and times spent by larvae for feeding per plant (food) within 3 hours observation) experiments. To depict the qualitative trend between the pupal weight and numbers of egg produced data were analyzed using regression analysis.

3. Results and Discussion

Development time of larvae and pupae and egg production. There was a significant difference ($P < 0.05$) in the development time of BAW larvae instars among treatments (**Table 1**). The development time of larval instars (L1, L2, L4 and L5) was significantly shorter ($P < 0.05$) when fed on okra than when fed on chilli. Larval instars four (L4) and five (L5) developed significantly faster ($P < 0.05$) on onion than on chilli. This indicates that both okra and onion are positively support the development and growth of BAW. There was no significant difference ($P > 0.05$) in development time of L3 among treatments. Interestingly, all larvae fed on brinjal died in the first instar stage. A separate trial conducted on the late instar larvae (L4) exposed to brinjal also showed the same effect. This indicates that brinjal extremely suppressed larval development and growth as such it is not a host of BAW. Gibson and Pickett (1983) reported that the hairs on brinjal leaves produced a chemical substance named as E - B - fenesen which repell insects from consuming it. There was no significant difference ($P > 0.05$) in the pupal development time among treatments.

The mean total fecal weight produced by larvae differed significantly ($P < 0.05$) among treatments. Larval fecal weight was significantly higher ($P < 0.05$) when they were feed on chilli than on tomato or okra. High fecal produced indicated that the food

Table 1. Development time of larvae and pupae of BAW fed on different food plants.

Stage (n = 150)	Development Time (Day ± S.E)				
	Okra	Onion	Tomato	Chillie	Brinjal
Larvae					
L1	2.00±0.00c	2.40±0.25bc	2.80±0.20 ab	3.00±0.00ab	3.20±0.20a
L2	2.00±0.00b	2.20±0.20ab	2.40±0.25ab	2.80±0.20a	-
L3	2.20±0.20a	2.40±0.0.25a	2.80±0.20a	2.40±0.40a	-
L4	2.00±0.00b	2.00±0.00b	2.80±0.37ab	3.00±0.32a	-
L5	2.40±0.25b	2.60±0.25b	3.20±0.20ab	3.60±0.25a	-
Pupa	5.80±0.20a	5.60±0.25a	6.20±0.37a	5.80±0.20a	-

Mean with the same letters in row are not significantly difference (P>0.05)

Table 2. Developmental times of DBM larvae and pupae fed on different food plants

Food Plants	Common names	Developmental times (days ± S.E.)	
		Larva	Pupa ¹
Cultivated			
<i>Brassica juncea</i> Cosson	Sawi	10.10 ± 2.32b	4.62 ± 0.81ab
<i>B. juncea</i> Cosson var. <i>rugose</i> Bally	Kai Choy	9.12 ± 3.11c	4.10 ± 0.56b
<i>B. alba</i> Rebenh	Kai Lan	10.87 ± 1.97a	2.34 ± 1.22c
<i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> Bally	Sawi Putih	9.38 ± 2.43c	4.01 ± 1.56b
Wild			
<i>B. juncea</i> L. (Czern)	Indian Mustard	9.89 ± 3.13b	4.86 ± 0.78a
<i>Cleome rutidosperma</i> D.C ²	Purple Maman	9.93 ± 2.65b	5.01 ± 0.85a

¹ From start of pupation until adult emergence; ² Capparidaceae, others are Brassicaceae

Means in column with same letter were not significantly different (P > 0.05, Fisher's Protected LSD)

consumed are not fully digestible by the digesting system (Ridley 1986). There was a positive and significant correlation (r = 0.96) between the total weight of fecal produced and its development time. This indicates that the low digestible food would prolong larval development time.

The developmental time of DBM larvae was significantly (P < 0.05) shorter when larvae were fed on *B. juncea* var. *Rugose* and *B. oleracea* var. *alboglabra* (cultivated) than on the *B. alba* and *B. juncea* (cultivated), and *B. juncea* and *C. rutidosperma* (wild) (Table 2). Interestingly, the development time was significantly (P< 0.05) prolonged by the cultivated food plant, *B. alba*, and not by the wild food plants, *B. juncea* (Czern) and *C. rutidosperma*. This indicates that host food

plants had different effects on the developmental time of DBM larvae. The developmental time of DBM larvae might be affected by the glucosinolates because DBM larvae cannot discriminate between different types of glucosinolates present in the food plants.

The developmental time of DBM pupa was significantly (P < 0.05) longer when larvae were fed wild food plants than the cultivated food plants (Table 2). In contrast, the development time of *H. undalis* pupae fed on *C. rutidosperma* (wild) was significantly shorter than when fed cultivated *Brassica* species (Sivapragasam et al., 1994). Some types of glucosinolates of *C. rutidosperma* were reported to slow down the developmental rate of DBM pupae (Wallbank & Wheatly,

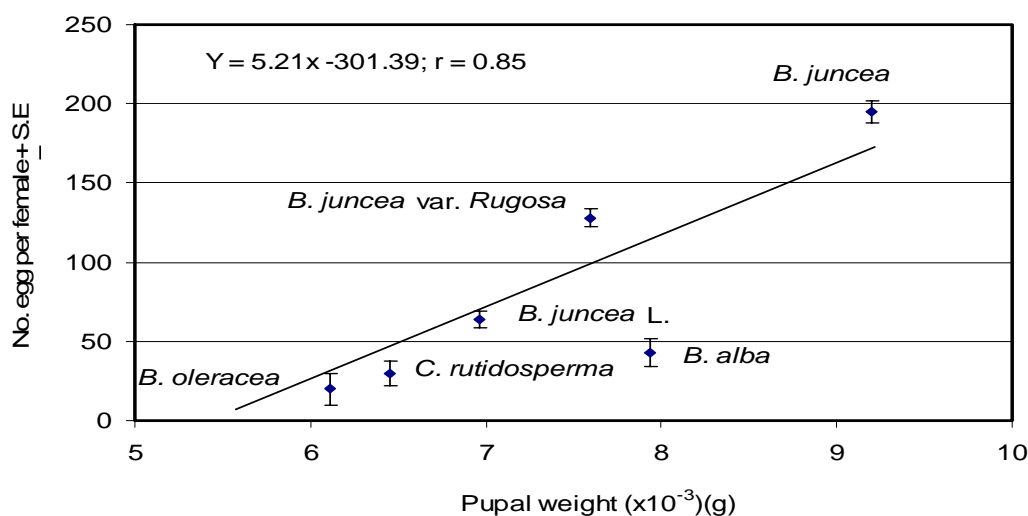


Figure 1. Relationship between number of egg and pupal weight when DBM larvae fed on different food plant

1976). There was strong relationship ($r = 0.85$, $P < 0.05$) between the numbers of eggs laid by adult DBM females and the weight of pupae developed from larvae fed on different food plants (Fig. 1). DBM larvae fed on *B. juncea* (cultivated) resulted in higher pupal weight and more productive females (laid more eggs) than fed on other food plants. This suggests that there exist qualitative differences between food plants that affect development and reproduction of DBM. Study conducted by Fox et al. (1990) also found that the quality of cabbage plant is positively correlated with the size of DBM larva or pupa.

Feeding Behavior. BAW. In a choice test, the time taken by BAW larvae to reach the food, stay on food, feeding and leaving the food offered was significantly different ($P < 0.05$) among treatments (Fig. 2). BAW larvae were found to only choose okra, onion and chilli, and never observed to go towards the tomato or brinjal. However, the time taken to reach, staying on, feeding and leaving the okra, onion and chilli was not significantly different. This suggests that presence of more than one type of plant in choice test could reduce larval olfactory ability to allocate their preferred food plants. Aroma produced by onion foliage could stimulate larval olfactory attractant (Dindonis & Miller 1981). Larvae staying on and time to leave food time in choice test were relatively longer on okra than on onion or chilli. This indicates that larvae preferred okra than onion or chilli. The presence of other food plants in

this test seemed not to cause larvae to leave okra quickly. In a no choice test, there was a significant different ($P < 0.05$) in feeding time of larvae on food plants among treatments. In contrast to a choice test, BAW larvae were observed to reach and staying on the brinjal and tomato. The feeding time of BAW larvae was significantly longer ($P < 0.05$) on okra and onion than on tomato, chilli or brinjal. BAW larvae spent significantly shorter time to feed on brinjal than on okra, onion and chilli. This tends to support our no choice test study that BAW larvae do not prefer brinjal and tomato. However, the time taken by BAW larvae to reach, staying on and leaving the food was not significantly different among treatments.

Overall, result of both choice and no choice tests indicated that BAW larvae preferred okra and onion. This is because of their shorter development time and longer time spent to feed on okra and onion as compared to other plants. BAW attracted to okra and onion by volatile compound and terpenoid contained in them. Terpenoid in plants was known to act as pheromone to the pest and this indirectly induced infestation of the plants by BAW (Riddiford 1967). In addition, onion plant also produced aroma that could stimulate olfactory attractant to BAW larvae. The larval feeding time on chilli in both choice and no choice tests were shorter as compared to okra and onion. This is because the larvae could not tolerate to toxicity of Djenkolic Acid contained in the chilli plant (Nas 1973). BAW larvae seemed to

Table 3. Time (minutes \pm S.E) taken or spent by diamondback moth third instar larvae (a) to reach food and (b) feeding in no-choice and choice tests^{1,2}

Food plants	No-choice test		Choice test	
	To reach fo	Feeding	To reach food	Feeding
Cultivated				
<i>Brassica juncea</i> Cosson	28.31 \pm 10.32b	30.02 \pm 9.01b	4.43 \pm 2.10b	35.58 \pm 10.13a
<i>B. juncea</i> Cosson var. <i>rugose</i> Bally	10.54 \pm 3.12c	45.83 \pm 8.92a	5.21 \pm 2.31b	20.65 \pm 5.34b
Wild				
<i>B. juncea</i> L (Czern.)	50.01 \pm 10.67a	15.23 \pm 3.50c	5.32 \pm 2.05b	10.89 \pm 3.54c
<i>Cleome rutidosperma</i> D.C	12.43 \pm 4.21c	16.54 \pm 3.21c	8.93 \pm 3.23b	18.75 \pm 6.27b

¹ observation was made from 1400 to 1700 h (3 hours)

² Means in column with same letters were not significantly different ($P > 0.05$, Fisher's Protected LSD).

ignore tomato and brinjal in choice test; these two plants are not the host of *S. exigua*. This may due to presence of alkaloids in both of these Solanaceae plants (Beck & Reese 1976). Chemical repellent, E – B – fenesen in brinjal could extremely avoid larvae from consuming it (Gibson & Pickett 1983).

DBM. The feeding time spent by DBM larvae in 3 hours observation periods was significantly ($P < 0.05$, Fisher's Protected LSD) longer on the cultivated than on the wild food plants except in a choice test (**Table 3**), indicating that wild food plants are not good food sources for DBM. In contrast, feeding responses of DBM on the wild food plants (Capparidaceae; *Capparis flexuosa* and *C. spinosa*) was as active as on the cultivated Brassicaceae plants. In a no-choice test, DBM larvae took significantly ($P < 0.05$, Fisher's Protected LSD) shorter time to reach *C. rutidosperma* and *B. juncea* var. *rugose* than the other food plants (Table 3). In contrast, the time taken by DBM larvae to reach the food sources in a choice test was not significantly different among food plants.

Results showed that both cultivated *B. juncea* was a better food plants of DBM (higher numbers of egg produced per adult female, and longer time spent feeding on it), as compared with the other food plants. This suggests that it should not be planted alone if we want to avoid heavy infestation of DBM and reduce pesticide

usage. The *C. rutidosperma* and *B. juncea* var. *rugose* (in both tests) might have higher concentration of glucosinolates that act as feeding attractants as compared with wild *B. juncea* as times taken by DBM larvae to reach *C. rutidosperma* and *B. juncea* var. *rugose* were shorter than to wild *B. juncea* (Table 4). However, *C. rutidosperma* or *B. juncea* var. *rugose* might not have or having similar concentration of feeding stimulant with *B. juncea*. There seemed to be no difference in food quality offered by the two wild food plants as the pupal weight and egg produced per female are somewhat similar. Although *B. oleracea* var. *alboglabra* and *B. alba* seemed to have similar food quality as indicated by their effect on the pupal weight or numbers of egg produced by DBM females, we did not test the feeding behaviour of DBM larvae on them.

C. rutidosperma is a ubiquitous weed in Malaysia while wild *B. juncea* was introduced from India (Anderson, 1974). Wild *B. juncea* was also proved to possess an oviposition attractants that make it possible to be used as trap crop. In Malaysia, it is not practical to interplant wild *B. juncea* with *Brassica* crops due to socioeconomic reason. However, we can plant it around the field and do insecticide spraying only when necessary. This could reduce DBM and other cabbage pest's population in the field as well as insecticide-resistance development. Unlike wild *B. juncea*,

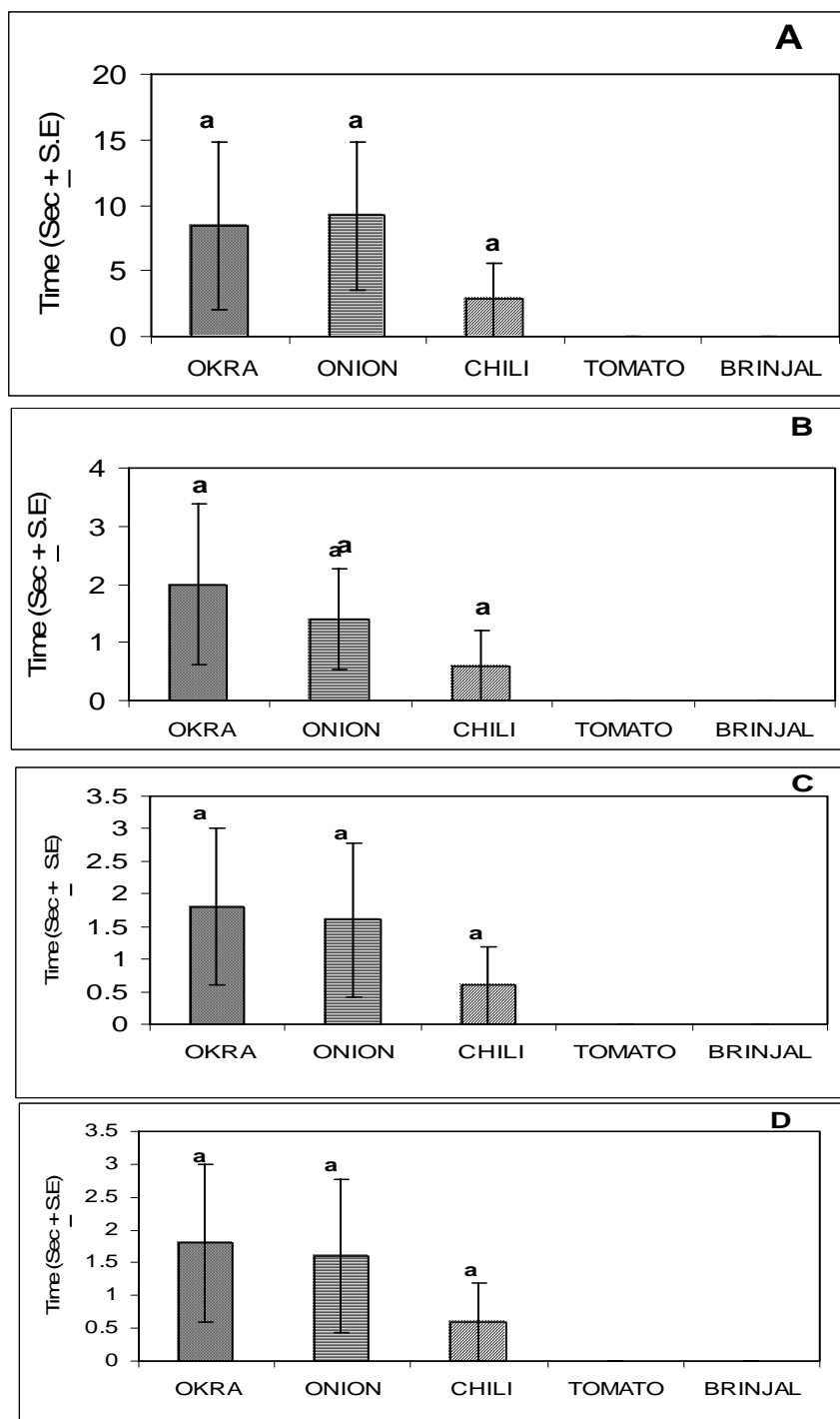


Figure 2. Mean time taken to reach (A), staying on food (B), feeding on food (C), and leaving food (D) plant by BAW in a choice test experiment

effect of *C. rutidosperma* on DBM oviposition behavior has never been studied. We can diverge DBM oviposition activity from the cultivated brassicas, especially near or at the critical growth stages, to a *C. rutidosperma* (if it is found to possess oviposition attractant) planted around or within a field. When *C.*

rutidosperma is not needed it can be easily pulled out manually; therefore, weedicides use is not necessary. Since cultivated *B. juncea* seemed to be a good food plant of DBM, it should be interplanted with other crops such as tomato. Bach and Tabashnik (1990) reported that DBM infestation was significantly lower in

the cabbage field interplanted with tomato plants than in the field planted with cabbage alone. We could also plant wild *B. juncea* around the plot or field planted with cultivated *B. juncea*, and this may be able to avoid a cultivated *B. juncea* from heavy infestation of DBM.

4. Conclusion

Although the foliage of chilli and tomato to a certain extent did not show an obvious effect on larval growth or preference, these plants could sustain larvae development to reach the adult stage. It is hoped that the results had add new information for effective integrated management program of BAW in Malaysia. For example, the severe damage caused by BAW larvae on okra or onion could be reduced through interplanting brinjal with okra or onion. Similarly, DBM development, reproduction and feeding behavior could be manipulated by inter-planting cabbages with non-host or less preferred plants.

5. Acknowledgments

We really indebted to Mr. Hussan Abd. Kadir of MARDI and Prof. Dzolkifli Omar of UPM for donating us the BAW and DBM. This project was funded by the Faculty of Science and Technology (Faculty of Life Sciences), Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor, Malaysia.

6. References

Ahmad, Y. and T. H. Ho, 1980. List of economic pests, host plants, parasites and predators in West Malaysia (1920-1978). *Ministry of Agriculture Malaysia. Bulletin No. 153*: 538 pp.

Anderson, M. R. 1974. Malayan wild flowers. Dicotyledons. The Malaysian Nature Publication, Kuala Lumpur. 450 pp.

Bach, C.E. and B.E. Tabashnik. 1990. Effects of nonhost plant neighbors on population densities and parasitism rates of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Environ. Entomol.*, 19: 987-994.

Beck, S.D., Reese, J.C. 1976. Insect-plant interaction: nutrition and metabolism. Dlm. James W. Wallace & Richard L. Mansell (pnyt.) Biochemical interaction between plants and insects, hlm. 63 – 71. Plenum Press. New York and London.

Carlisle, D. B., Ellis, P. E., Betts, E. 1965. The influence of aromatic shrub on sexual maturation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Jour. Insect Physiol.* 11: 1541- 1558.

Cole, R. A. 1976. Isothiocyanates, Nitriles and Thiocyanates as Products of Autolysis of Glucosinolates in Cruciferae. *Phytochem.*, 15: 759-762.

Fox, L. R., D. K. Letourneau, J. Eisenbach, and S. V. Nouhuys. 1990. Parasitism rates and sex ratios of parasitoid wasp: Effect of herbivore and plant quality. *Oecologia*, 83: 414-419.

Gibson, R. W., Pickett, J. A. 1983. Wild potato repels aphid by release of aphid alarm pheromone. 302: 608 – 609.

Gupta, P.D. and A. J. Thorsteinson. 1960. Food plant relationships of the diamondback moth (*Plutella maculipennis* (Curt.)). *Entomol. Exp. Appl.*, 3: 241-250.

Idris, A. B., and E. Grafius. 1996. Effects of wild and cultivated host plants on oviposition, survival, and development of diamondback moth (Lepidoptera; Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environ. Entomol.*, 25: 825-833.

Nas, L. P. 1973. Toxicant occurring naturally in foods. Publ. No. 2117 Nat. Acad. Sci., Washington, D. C.

Riddiford, L.M.1967. Trans-2-hexenal: Mating stimulant for *Polyphemus* moths. *Science*, 158: 139 – 141.

Ridely, M. 1986. Animal behaviour: A concise introduction. Blackwell Scientific publication. University of Oxford.

Sivapragasam, A., A. Asma, and M. A. Rafi. 1994. Development and biotic potential of cabbage webworm (*Hellula undalis*) on the weed, *Cleome rutidosperma*. Paper presented at *International Conference on Plant Protection in the Tropics*, 23-31 March 1994, Kuala Lumpur, Malaysia.

Talekar, N. S., Shelton, A. M. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 38: 275-301.

Wallbank, B.E. and G.A. Wheatley. 1976. Volatile constituents from cauliflower and other crucifers. *Phytochem.*, 15: 763-766.

Sintesis dan Karakteristik Senyawa *Spin Crossover* $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Iis Siti Jahro¹⁾, Djulia Onggo¹⁾, Susanto Imam Rahayu¹⁾, Ismunandar¹⁾ dan Ibrahim Baba²⁾

¹⁾Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung,
Jl. Ganesha No. 10 Bandung, 40132, Indonesia
e-mail : djulia @ chem.itb.ac.id

²⁾Pusat Pengajian Sains Kimia, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM, Bangi, Selangor Darulehsan, Malaysia
e-mail : kpstm@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Senyawa $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ telah berhasil disintesis dari larutan senyawa besi(II) klorida dan ligan 4-Amino-1,2,4-triazole di bawah atmosfer gas nitrogen dalam pelarut metanol tanpa oksigen. Rumus molekul senyawa ini ditentukan atas dasar kadar unsur-unsur pembentuknya yakni Fe = 13,05 ; C = 16,61 ; H = 3,68 ; N = 36,12 % dan didukung oleh daya hantarnya sebesar $280 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ yang menunjukkan kompleks bermuatan +2. Senyawa ini termasuk kelompok spin crossover yang dibuktikan dari sifat magnetnya. Pada temperatur ruang (296 K) diamati harga momen magnet sebesar 2,99 BM dengan fraksi spin rendah 0,56 dan fraksi spin tinggi 0,44. Sejalan dengan meningkatnya temperatur maka fraksi spin rendah semakin berkurang dan fraksi spin tinggi semakin meningkat hingga pada temperatur 308 K, fraksi spin tinggi senyawa ini menjadi 1 dengan harga momen magnet 5,4 BM. Fenomena penyeberangan spin (spin crossover) ini berlangsung reversibel dan menunjukkan tipe histeresis dengan ΔT sekitar 4 K. Fenomena penyeberangan spin ini juga didukung oleh perubahan warna kompleks dari ungu menjadi putih dan sebaliknya.

Kata kunci : sintesis, spin crossover, $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2$, momen magnet, fraksi spin tinggi

1. Pendahuluan

Logam-logam transisi yang terkoordinasi secara oktahedral dengan konfigurasi $[\text{Ar}] d^4 - d^7$ dapat berada dalam dua keadaan elektronik yang berbeda, spin tinggi (*High Spin* = HS) dan spin rendah (*Low Spin* = LS) bergantung pada kekuatan medan ligan yang mengelilinginya. Dalam medan ligan kuat, molekul kompleks berada dalam keadaan dasar spin rendah sedangkan dalam medan ligan lemah molekul kompleks berada dalam keadaan spin tinggi. Dalam medan ligan sedang (*intermediate*), perbedaan energi (Δ_{HL}) diantara keadaan spin tinggi dan rendah cukup kecil sehingga adanya gangguan dari luar seperti temperatur, tekanan atau penyinaran dapat menyebabkan perubahan keadaan spin tinggi menjadi spin rendah atau sebaliknya (HS \leftrightarrow LS). Fenomena perubahan keadaan spin ini dikenal sebagai penyeberangan spin (*Spin Crossover* = SC) atau transisi spin (*Spin Transition* = ST)

(Gütlich, *et al.*, 2000)

Fenomena SC pertama kali diperkenalkan pada tahun 1930 oleh Cambi dkk yang terjadi pada senyawa turunan ditiokarbamato Fe(III). Saat ini fenomena SC telah diamati pada kompleks-kompleks logam transisi deret pertama dan kedua, namun yang paling banyak diteliti dan dilaporkan hasilnya adalah yang terjadi pada kompleks-kompleks Fe(II). Dalam kompleks oktahedral, ion Fe(II) dengan konfigurasi $[\text{Ar}] - 3d^6$ dapat memiliki keadaan elektronik spin tinggi $[t_{2g}^4 e_g^2]$ atau spin rendah $[t_{2g}^6 e_g^0]$. Dengan adanya 4 elektron tunggal maka pada keadaan spin tinggi ion Fe(II) bersifat paramagnet sedangkan pada spin rendah bersifat diamagnet karena semua elektronnya berpasangan. Oleh karena itu terjadinya transisi spin atau fenomena SC pada kompleks oktahedral Fe(II) mudah diidentifikasi. Fenomena SC pada kompleks Fe(II) pertama kali ditemukan oleh Baker dkk pada senyawa

[Fe(phen)₂(NCS)₂] dengan phen = 1,10-phenanthrolin (König, *et al.*, 1968). Selanjutnya sejak tahun 1970 hingga saat ini penelitian fenomena SC pada kompleks Fe(II) berkembang secara pesat, misalnya pada kompleks [Fe(dip)₂(NCS)₂] oleh König, *et al.* (1986), [Fe(pyq)₃][ClO₄]₂.H₂O oleh Onggo, *et al.* (1990), [Fe(dpa)₂][ClO₄]₂ oleh McCusker, *et al.* (1996), {[Fe(bt)(NCS)₂]₂[bpym]} oleh Real, *et al.* (1999), [Fe(NH₂trz)₃][BF₄]₂.H₂O oleh Kahn, *et al.* (1998), [Fe(btr)₃][ClO₄]₂ oleh Garcia, *et al.* (1999) dan [Fe(NH₂trz)₃][NO₃]₂ oleh Gütlich, *et al.* (2000). Penelitian-penelitian kompleks Fe(II) tersebut mengarah pada pemanfaatan senyawa kompleks sebagai sensor temperatur dan elemen aktif pada peralatan *display* serta memori. Sehubungan dengan pemanfaatannya sebagai elemen aktif pada memori maka senyawa SC dikenal sebagai material cerdas.

Pada makalah ini dilaporkan pembentukan dan karakter penyeberangan spin (*SC = Spin Crossover*) ion Fe(II) pada kompleks [Fe(NH₂trz)₃]Cl₂·3H₂O dengan indikator pengaruh temperatur terhadap sifat magnet dan tampilan warna kompleks tersebut.

2. Percobaan

Sintesis Kompleks Fe(II) dengan Ligan 4-Amino-1,2,4-triazole (NH₂trz = C₂H₄N₄)

Di dalam labu 50 mL ditimbang 0,4 gram FeCl₂·4H₂O kemudian secepat mungkin labu ditutup dan ke dalamnya dialirkan gas N₂ dan 6 mL

pelarut metanol. Di dalam labu yang lainnya dilarutkan 0,6 gram ligan NH₂trz dalam 10 mL pelarut metanol. Selanjutnya larutan ligan ditambahkan ke dalam labu berisi larutan FeCl₂·4H₂O menggunakan alat suntik. Campuran diaduk di bawah atmosfer N₂, endapan yang terbentuk disaring menggunakan kaca masir dan dikeringkan dalam desikator vakum berisi desikan P₂O₅.

Karakterisasi Senyawa Kompleks Fe(II)

Hasil Sintesis

Karakterisasi yang dilakukan terhadap senyawa kompleks Fe(II) hasil sintesis meliputi penentuan rumus molekul senyawa kompleks berdasarkan analisa kadar Fe dan unsur C, H, N, serta pengukuran daya hantarnya dan identifikasi karakter penyeberangan spinnya (*spin crossover*) berdasarkan pengukuran momen magnet dengan variasi temperatur mulai dari 273 hingga 308 K disertai penetapan fraksi spin tingginya.

3. Hasil dan pembahasan

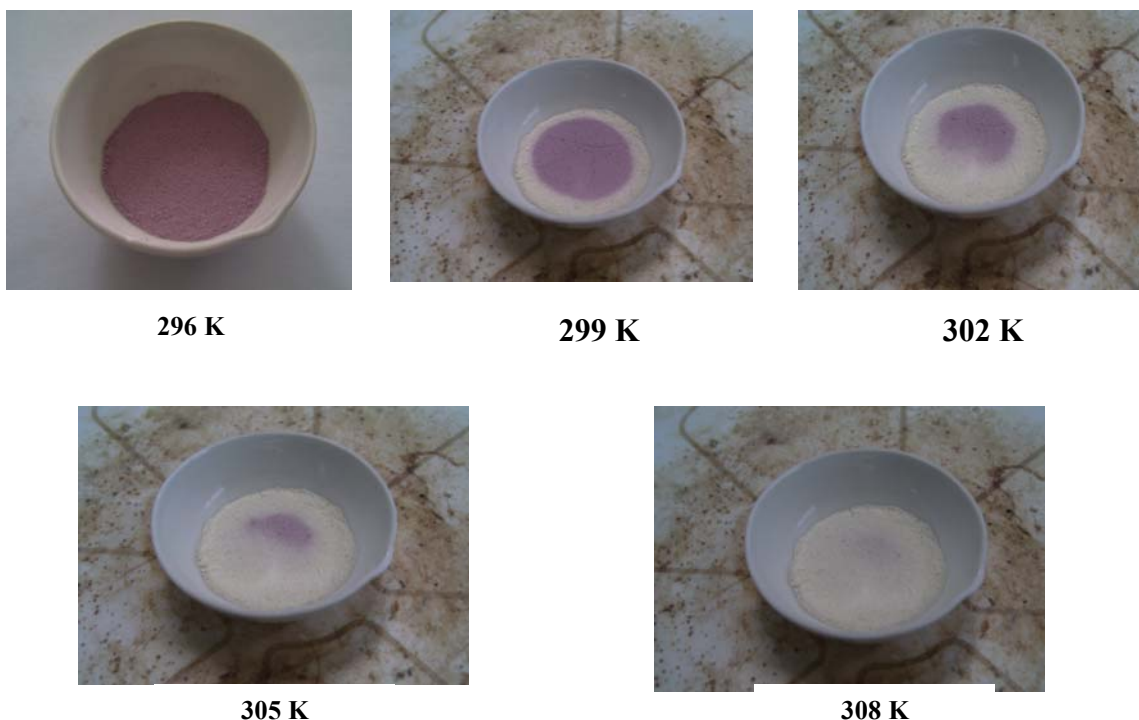
Senyawa kompleks Fe(II) dengan ligan 4-amino-1,2,4-triazole (NH₂trz = C₂H₄N₄) berhasil disintesis dalam bentuk serbuk padatan berwarna ungu, dari lima kali pengerjaan diperoleh berat total hasil sintesis 2,54 gram dengan rendemen berkisar 60 – 63 %. Hasil analisis komposisi kimia yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan senyawa kompleks yang diperoleh memiliki rumus molekul [Fe(C₂H₄N₄)₃]Cl₂·3H₂O atau biasa dituliskan sebagai [Fe(NH₂trz)₃]Cl₂·3H₂O.

Tabel 1 Hasil analisis kadar komponen-komponen penyusun senyawa kompleks [Fe(NH₂trz)₃]Cl₂·3H₂O

Kadar	Kadar komponen penyusunnya (%)			
	Fe	C	H	N
Praktis	13,15	16,61	3,68	36,12
Teoritis	12,90	16,64	4,20	38,81

Tabel 2 Hasil pengukuran daya hantar kompleks [Fe(NH₂trz)₃]Cl₂·3H₂O pada temperatur 25° C (Konsentrasi = 0,001 mol, K dalam Ω⁻¹.cm⁻¹ dan Λ dalam Ω⁻¹.cm².mol⁻¹)

Larutan	K	Λ	Jumlah ion	Muatan kation
Aqua DM	2	0	0	0
NaNO ₃ (aq)	133	131	2 (+1, -1)	+1
MgCl ₂ (aq)	285	283	3 (+2, -1, -1)	+2
[Fe(NH ₂ trz) ₃]Cl ₂ ·3H ₂ O	282	280	3 (+2, -1, -1)	+2



Gambar 1 Perubahan warna serbuk padatan kompleks $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pada temperatur 296 – 299 K

Rumus molekul senyawa kompleks ini didukung oleh hasil pengukuran daya hantarnya yang menunjukkan kompleks bersifat ionik dengan daya hantar dalam pelarut aqua DM sebesar $280 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Bila dibandingkan dengan daya hantar MgCl_2 dalam pelarut aqua DM sebesar $283 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ maka dapat disimpulkan kompleks Fe(II) ini bermuatan +2 (Tabel 2).

Kompleks $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ larut dalam pelarut organik (etanol, metanol, dimetilsulfoksida dan dimetilformamida) maupun air. Dalam pelarut etanol, metanol dan air kompleks Fe(II) ini mula-mula menghasilkan larutan berwarna ungu muda tapi beberapa saat kemudian berubah menjadi tidak berwarna (bening). Sedangkan dalam pelarut dimetilsulfoksida dan dimetilformamida, larutan kompleks Fe(II) yang semula berwarna ungu muda beberapa saat kemudian berubah menjadi kuning, diduga dalam kedua pelarut terakhir ini Fe(II) mengalami oksidasi menjadi Fe(III). Perubahan warna larutan kompleks $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam pelarut etanol, metanol dan air ini didukung oleh perubahan warna pada uji tampilan fisiknya berupa pemanasan secara perlahan padatan serbuk kompleks yang menunjukkan serbuk senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ yang pada

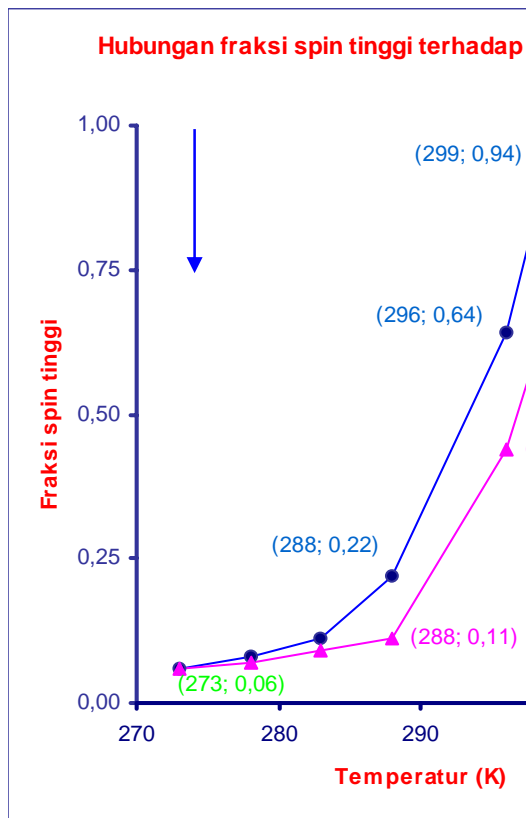
temperatur ruang (296 K) berwarna ungu maka pada temperatur sekitar 299 K mulai berubah menjadi agak putih dan akhirnya menjadi sempurna putih pada temperatur sekitar 308 K (Gambar 1). Perubahan warna kompleks ini berlangsung reversibel, sejalan dengan menurunnya temperatur dari 308 K ke temperatur ruang maka warna kompleks secara berangsur-angsur berubah kembali dari putih menjadi ungu.

Perubahan warna senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{NH}_2\text{trz})_3]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ merupakan salah satu indikasi bahwa kompleks ini memiliki karakter **penyeberang spin** (*spin crossover*). Untuk membuktikan indikasi terjadinya penyeberang spin dalam senyawa kompleks ini maka dilakukan pengukuran kerentanan magnetnya sejalan dengan meningkatnya temperatur mulai dari 273 hingga 308 K dan kebalikannya, sejalan dengan menurunnya temperatur dari 308 hingga 273 K. Dengan menggunakan rumusan :

$$\mu_{\text{teramati}} = X_{\text{st}} \cdot \mu_{\text{st}} + X_{\text{sr}} \cdot \mu_{\text{sr}}$$

.....(Onggo dan Sugiharto, 2001),

dengan X_{st} adalah fraksi spin tinggi, X_{sr} adalah fraksi spin rendah, nilainya sama dengan $(1 - X_{\text{st}})$, μ_{st} adalah nilai limit momen magnet spin tinggi sekitar 5,4 BM dan μ_{sr} adalah nilai limit



Gambar 2 Hubungan fraksi spin tinggi kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ terhadap temperatur

momen magnet spin rendah sekitar 0,7 – 1 BM, maka dapat ditentukan fraksi spin tinggi dan rendah kompleks Fe(II) dalam senyawa $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ berdasarkan harga momen magnet teramatinya pada berbagai temperatur pengukuran yang digunakan.

Pada temperatur ruang (293 K) harga momen magnet senyawa kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ sebesar 2,99 BM menunjukkan serbuk padatan kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ hasil sintesis merupakan campuran kompleks F(II) pada keadaan spin tinggi dan rendah dengan fraksi spin rendah (0,56) lebih besar daripada fraksi spin tinggi (0,44). Pemberian energi pemanasan berupa peningkatan temperatur menyebabkan kompleks pada keadaan spin rendah mengalami perubahan keadaan spin menjadi kompleks spin tinggi sehingga harga momen magnet dan fraksi spin tinggi semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya temperatur dan pada temperatur 308 K diperkirakan semua kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ keadaan spin rendah sempurna mengalami penyeberangan spin menjadi kompleks spin tinggi yang ditandai dengan harga fraksi spin tinggi sebesar 1 dan momen

magnet 5,4 BM. Sebaliknya penurunan temperatur dari temperatur ruang (293 K) hingga temperatur 273 K menurunkan fraksi spin tinggi kompleks ini dari 0,44 menjadi sekitar 0,06 akibat kompleks spin tinggi mengalami perubahan menjadi kompleks spin rendah. Fenomena penyeberangan spin kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ ini berlangsung reversibel tetapi pola perubahan spin pada saat peningkatan temperatur dari 273 – 308 K berbeda dengan pola perubahan spin kebalikannya, pada saat penurunan temperatur dari 308 – 273 K sehingga memunculkan histeresis dengan lebar (ΔT) sekitar 4 K.

4. Kesimpulan

Senyawa kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ telah berhasil disintesis dari senyawa $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ dan ligan 4-Amino-1,2,4-triazole ($NH_2trz = C_2H_4N_4$). Rumus molekul senyawa kompleks dibuktikan dari data hasil analisis kadar unsur-unsur pembentuknya dan didukung oleh data daya hantarnya.

Pada temperatur ruang senyawa kompleks $[Fe(NH_2trz)_3]Cl_2 \cdot 3H_2O$ hasil sintesis merupakan campuran kompleks Fe(II) pada

keadaan spin tinggi dan spin rendah dengan fraksi spin rendah lebih besar daripada fraksi spin tinggi. Pada temperatur 308 K semua kompleks spin rendah sempurna mengalami penyeberangan spin (*spin crossover*) menjadi kompleks spin tinggi yang ditandai dengan perubahan harga fraksi spin tinggi dari 0,44 menjadi 1 dan momen magnet dari 2,99 menjadi 5,4 BM serta perubahan warna serbuk kompleks dari ungu pada keadaan spin rendah menjadi putih pada keadaan spin tinggi.

5. Daftar Pustaka

Garcia, Y., Kahn, O., Rabardel, L., Chansou, B., Salmon, L., and Tuchogues, J.P., (1999), Two-Step Spin Conversion for the Three-Dimensional Compound Tris(4,4'-bis-1,2,4-triazole)iron(II) Dipchlorate, *Inorg. Chem.*, **38**, 4663-4670.

Gütlich, P., Garcia, Y., and Goodwin, H.A., (2000), Spin Crossover Phenomena in Fe(II) Complexes, *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 419-427.

Kahn, O., and Martinez, J., (1998), Spin Transition Polymers: From Molecular Materials Toward Memory Devices, *Science*, **279**, 44-48.

König, E., Madeja, K., and Watson, K.J., (1968), Reversible Quintet-Singlet Transition in Dithiocyanatobis(2,2'-dipyridyl)iron(II), *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1146-1153.

McCusker, J.K., Rheingold, A.L., and Hendrickson, D.N., (1996), Variable-Temperature Studies of Laser-Initiated $^5T_2 \rightarrow ^1A_1$ Intersystem Crossing in Spin Crossover Complexes: Empirical Correlations between Activation Parameters and Ligan Structure in a Series of Polypyridyl Ferrous Complexes, *Inorg. Chem.*, **35**, 2100-2112

Onggo, D., Hook, J.M., Rae, A.D., and Goodwin, H.A., (1990), The Influence of Steric Effects in Substituted 2,2'-Bipyridine on the Spin State of Iron(II) in $[FeN_6]^{2+}$ Systems, *Inorganica Chimica Acta*, **173**, 19-30.

Onggo D, dan Sugiharto, H.K., (2001), Transisi Spin Pada Senyawa Kompleks Besi(II) dengan Ligan Bidentat Beratom Donor Nitrogen, *Jurnal Pendidikan Matematika dan Sains*, **1**, IV, 43 – 49.

Real, J.A., et al., (1999), Light Induced Excited Pair Spin State in an Iron(II) Binuclear Spin-Crossover Compound, X., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10630-10633.

Immunosuppressive and Antiinflammatory Compounds From Malaysian Medical Plants

Ikram M. Said¹⁾, Laily B. Din¹⁾, A. Latiff¹⁾ and Shigeo Tanaka²⁾

1) Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E. *e-mail*: kiam@pkrisc.cc.ukm.my

2) Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502. *e-mail*: stanaka@nodai.ac.jp

Abstract

In our search for agents effective against immune-mediated disorders and inflammation, we have screened several Malaysian medicinal plants for their ability to inhibit the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) on the surface of murine endothelial cells (F-2) and mouse myeloid leukemia cells (M1) respectively. A number of plant extracts consisting of different families and genera were tested of which some extracts showed significant activities against ICAM-1 and VCAM-1. Bioassay directed fractionation of two plants namely Goniiothalamus andersonii and Alstonia spatulata resulted in the isolation of compounds with interesting results indicating the possibility of their use as sources of immunosuppressive and anti-inflammatory substances. Goniiothalamine and gonodiol from G. andersonii were found to inhibit the cell surface expression of both ICAM-1 and VCAM-1, while alstonisine from A. spatulata inhibited the cell surface expression of VCAM-1 by more than 50% which was better when compared to seven other congener alkaloids from the same genus.

1. Introduction

Allergic diseases including asthma and pollinosis is becoming more common, especially in industrialized societies, particularly for children who are more sensitive towards allergens. A study of 7-12 year old primary school students in Kuala Lumpur showed that the prevalence of asthma was 8.7% (Omar, 1990) while a study on 124 adult patients with bronchial asthma, 65% of them had associated rhinitis (Yaacob and Ellango, 1991). Similarly Japan reported prevalence of bronchial asthma in school children had risen from 4.6% to 6.4% during a ten year period from 1982 to 1992, especially for children who had family histories of allergic diseases. Some of the allergens that are responsible are due to air pollution, pollens, house dust, cat fur, molds, and smoke (incense smoke or passive smoking).

A lot of drugs including anti-histamines, antiinflammatories, bronchodilators, anticytokines, platelet-activating factor

antagonists and leukotriene pathway inhibitors have appeared on the market for the treatment of allergic diseases.

To take advantage of the Malaysia's biodiversity, a research cooperation between Malaysia and Japan was initiated in 1996 for a 5-year term under the auspices of NEDO (Japan) and SIRIM (Malaysia) in which the main aim was the conservation and sustainable use of tropical bioresources (Zakri and Mat-Salleh, 1998). The project consisted of five main themes of which two were directly related to natural products i.e.

- (i) screening and isolation of bioactive compounds, microorganisms and higher plants,
- (ii) evaluation of therapeutic and toxic potentials of natural products.

Due to the prevalence of allergy-related diseases in Malaysia and Japan, our research group in UKM were able to link up with Prof. Tanaka's group in Kyoto University (later on with the Tokyo Agriculture University) where

facilities were already in place for the testing of anti-allergic natural products using endothelial cells.

2. Experimentals

Plant materials. Plant samples were collected from all over Malaysia and voucher specimens were deposited in the herbarium of UKM Bangi. Each plant material (20g) was extracted at room temperature with either methanol, chloroform and pet. Ether (PE)

Fractionation and identification of active principles. The dried ground bark of *Goniothalamus andersonii* (500g) was extracted with petroleum ether followed by ethyl acetate and the resulting solutions evaporated to dryness. The ethyl acetate extract was applied on to a silica gel column and eluted with chloroform to yield mainly goniothalamine and goniodiol as active components of *G. andersonii*. Powdered roots of *A. spatulata* (860g) was extracted with methanol at room temperature for 3 days (2x) and the resulting crude methanol extract (88.2g) was worked up for the alkaloid content in the usual manner (acid-base extraction) to yield the crude alkaloids (4.75g). Further fractionation via bioactivity directed column chromatography yielded the bioactive alkaloids which were identified by the usual spectroscopic techniques.

Spectral data. NMR and MS were measured using Jeol JNM-LA500 and Jeol JMS-HX110 respectively

Bioassay. Cell surface expression of ICAM-1 and VCAM-1 were measured using established methods (Tanaka *et al.* 2001).

3. Results and Discussion

A total of 29 extracts were tested for the inhibition of cell surface expression of ICAM-1 and VCAM-1 (Table 1). Flow cytometry analyses showed that a number of our samples reduced the expression of ICAM-1 and VCAM-1 indicating the potential of these plants having chemical constituents that act as immunosuppressive and anti-inflammatory principles. Samples that significantly downregulated the expression of ICAM-1 were the extracts of *Ancistrocladus tectorius* and *Tabernaemontana macrocarpa* while *Dehaasia incrassata*, *Mitragyna speciosa*, *Cinnamomum povectum* and *Cucurma domestica* increased the cell surface expression of ICAM-1. It is

interesting to note that most of the samples tested are alkaloid containing plants due to the group's interest in alkaloidal plants. Several extracts prepared from *Alstonia spatulata*, *Dehaasia incrassata*, and *Rauwolfia perakensis* reduced the level of VCAM-1 to less than half of the control value. A petroleum extract of *Eupatorium odoratum*, however, promoted the VCAM-1 expression. It was also observed that extracts of *D. incrassata* roots were capable of downregulating both ICAM-1 and VCAM-1.

Due to their availability in large quantities, two plant samples were chosen for detailed analysis of the chemical constituents that were active in the respective bioassays. Both *G. andersonii* and *G. fasciculatus* were selective in inhibiting VCAM-1 cells only while *A. spatulata* was selective against VCAM-1. Isolation and consequent testing of goniothalamine and goniodiol indicated that both compounds dose-dependently downregulate not only the level of VCAM-1 but also that of ICAM-1, suggesting the crude extracts may contain some other inhibitors of VCAM-1. On the other hand, bioassay-guided isolation of the active constituents of *A. spatulata* identified alstonisine as the component that was responsible for the inhibition of the cell surface expression of VCAM-1 by 52.5%. Tests on other alkaloids from *Alstonia* were not as effective as alstonisine, most of which showed VCAM-1 expression at 12.5 µg/ml by more than 70% (see Table 2 and Figure 1).

It would be difficult to choose the right plant candidate for testing from ethnobotanical data since the old literature would not list anti-inflammatory or immunosuppressive use of the medicinal plants. However it would be worthwhile to look at medicinal plants used for "inflammatory symptoms" such as wounds, bruises, carbuncles, sting by insects, rheumatism, ulcers, throat complaints and bronchitis. Burkill (1936) do describe some of these and have been shown in the results for *Kadsura scandens* which has been traditionally used for rheumatism, a kind of autoimmune disorder.

4. Conclusion

Cell surface expression of ICAM-1 and VCAM-1 is known to be associated with a variety of immune and inflammatory disorders

although it is not the only bioassay available to indicate such activities of natural products. Our research programme has successfully shown that natural products from Malaysian medicinal

plants are a potential source of therapeutic principles for anti-allergic drugs although a more thorough investigation is needed for the programme to progress further.

Table 1: Effect of various extracts of Malaysian medicinal plants on the cell surface expression of ICAM-1 and VCAM-1

Test Sample	Part used	Extraction	Relative amount of ICAM-1 (%)	Relative amount of VCAM-1 (%)
Acanthaceae <i>Andrographis paniculata</i>	aerial	MeOH	97.3	87.2
Ancistrocladaceae <i>Ancistrocladus tectorius</i>	stem bark	MeOH MeOH	45.5 42.1	90.2 81.6
Annonaceae <i>Fissistigma kinabaluensis</i> <i>F. latifolium</i> <i>Goniothalamus andersonii</i> <i>G. fasciculatus</i> <i>Polyalthia bullata</i>	stem stem bark leaf root	PE MeOH PE MeOH CHCl ₃	90.4 82.6 109.1 106.9 75.5	74.9 86.0 78.4 76.4 105.2
Apocynaceae <i>Alstonia angustifolia</i> <i>Alstonia spatulata</i> <i>Kopsia dasyrachis</i> <i>Rauwolfia perakensis</i> <i>Tabernaemontana macrocarpa</i>	bark root leaf root bark leaf root	MeOH MeOH MeOH MeOH MeOH MeOH MeOH	104.3 113.7 91.7 111.0 111.8 74.5 46.9	108.7 69.0 44.2 103.9 46.9 83.3 93.6
Araceae <i>Acorus calamus</i>	rhizom	MeOH	97.3	87.2
Compositae <i>Elephantopus scaber</i> <i>Eupatorium odoratum</i>	whole whole	MeOH CHCl ₃	94.4	104.5
Gramineae <i>Cymbopogon citratus</i>	whole	MeOH	50.1	83.2
Lauraceae <i>Cinnamomum povectum</i> <i>Dehaasia incrassata</i>	bark fruit leaf root	H ₂ O CHCl ₃ MeOH MeOH	127.9 92.0 98.9 80.9	61.0 34.7 47.0 51.5
Leguminosae <i>Cassia alata</i>	leaf	MeOH	96.5	71.2
Rubiaceae <i>Mitragyna speciosa</i> <i>Prismatomeris malayanus</i>	root leaf root	CHCl ₃ MeOH MeOH	94.7 86.5 61.5	52.3 107.7 91.8
Schisandraceae <i>Kadsura scandens</i>	stem	MeOH	105.1	69.0
Zingiberaceae <i>Cucurma domestica</i>	rhizom	MeOH	103.3	60.5

Dose of each plant extract 12.5 µg/ml ; 0.6% DMSO used as control

Table 2: Inhibitory effect of isolated compounds on the expression of ICAM-1 and VCAM-1

Compound	Relative amount of ICAM-1 (%)	Relative amount of VCAM-1 (%)
Goniotalamin	52.7	67.1
Goniodiol	45.8	42.4
Alstonerine	nt	101.6
Alstophylline	nt	108.7
Quaternine	nt	79.6
Volkenseine	nt	90.5
Vincorine	nt	77.0
10-methoxy-N ₁ -methylburnamine-17-O-benzoate	nt	72.5
17-deacetyl-5 α ,10-dimethoxyakuammiline 17-O-3',4',5'-trimethoxybenzoate	nt	86.0
Alstonesine	nt	52.5
Isoliquiritigenin	52.8	66.8

Dose of each compound 12.5 μ g/ml ; 0.6% DMSO used as control; nt = not tested

5. Acknowledgements

We would like to thank the Japan Bioindustry Association (JBA) and NEDO for a grant that enabled the work to be carried out in Japan and Malaysia. We would also like to thank the Malaysian government for their financial support (via an IRPA funding) and UKM for some financial aid (short term grant) and the use of various facilities.

6. References

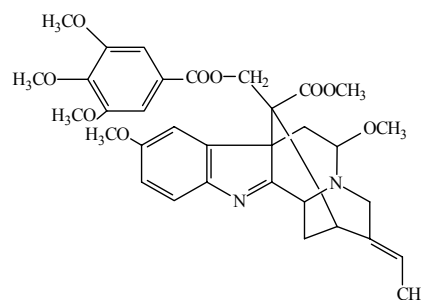
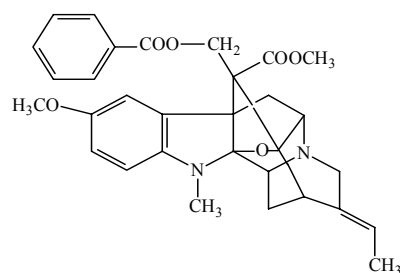
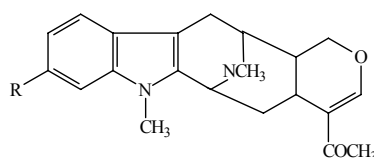
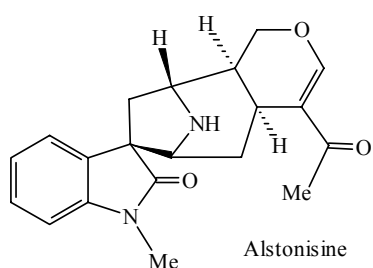
Burkill, I.H.,(1936). *A Dictionary of the Economic Products of Malay Peninsula*, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Kuala Lumpur.

Omar, A.H., (1990). *Acta Paediatr. Jpn.*, **32**, 183.

Tanaka, S., Yoichi, S., Ao, L., Matumoto, M., Morimoto,K., Akimoto, N., Honda, G., Tabata, M., Oshima, T., Masuda, T., Asmawi, Z., Ismail, Z., Yusof, S., Din, L.B., Said, I.M., (2001). *Phytother. Res.*, **15**, 681-686.

Yaacob, I. and Elango, S., (1991). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, **9**, 39.

Zakri, A.H. and Mat-Salleh, K.(Editors), (1998). *Conservation and Sustainable Use of Biodiversity: Malaysia-Japan Initiative*. Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.



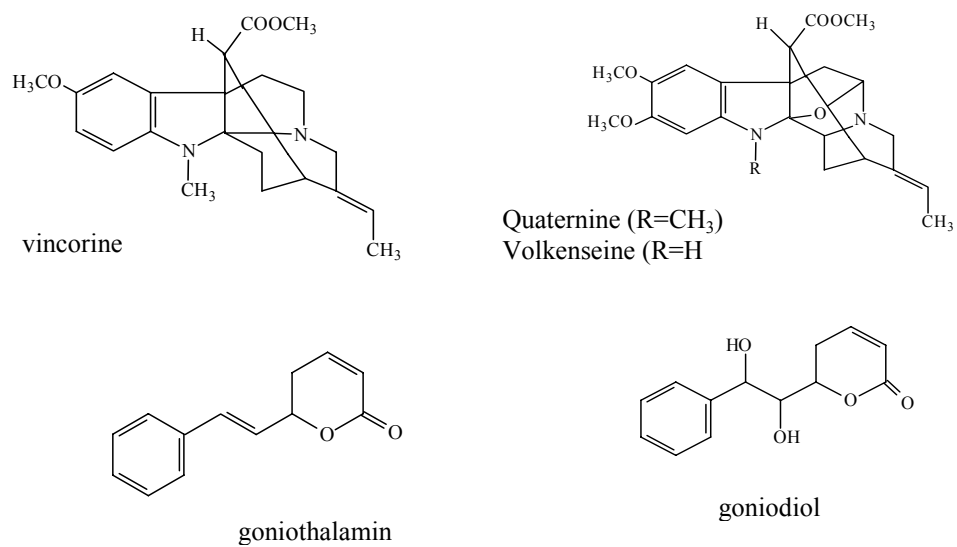


Figure 1: Structures of compounds isolated and tested against ICAM-1 and VCAM-1

Kudraflavon C dan Artokarpin, Dua Senyawa Flavonoid Terisoprenilasi dengan Aktivitas Sitotoksik dari *Artocarpus heterophyllus* Lamk

Iqbal Musthapa¹⁾, Euis H. Hakim¹⁾, Yana M. Syah¹⁾, Lia D. Juliawaty¹⁾, Sjamsul A. Achmad¹⁾, Lukman Makmur¹⁾, Zalifah Latif²⁾, Laily B. Din²⁾, Ikram M. Said²⁾

¹⁾ Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10, Bandung 40132, Indonesia

²⁾ School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E, Malaysia

Abstrak

Dua senyawa flavonoid terisoprenilasi, yaitu kudraflavon C (1) dan artokarpin (2) telah berhasil diisolasi dari kayu batang *Artocarpus heterophyllus*. Penentuan struktur terhadap kedua senyawa tersebut dilakukan berdasarkan data spektroskopi, serta melalui perbandingan dengan senyawa standar. Senyawa 1-2 memperlihatkan sifat sitotoksik yang kuat terhadap sel murine leukemia P-388.

Kata kunci : *Artocarpus heterophyllus*, flavonoid terisoprenilasi, kudraflavon C, artokarpin, sel murine leukemia P-388

1. Pendahuluan

Artocarpus heterophyllus Lamk, dikenal masyarakat sebagai tumbuhan nangka, merupakan salah satu tumbuhan dari genus *Artocarpus* (Moraceae). Genus ini terdiri dari 50 species yang tersebar mulai dari India, Cina Selatan, Semenanjung Malaysia sampai Kepulauan Solomon (Jarret, 1959).

Laporan di literatur memperlihatkan bahwa genus ini mengandung sejumlah senyawa turunan fenol yang termasuk golongan senyawa flavonoid terisoprenilasi yang unik, yang bersifat promotor anti tumor, dan memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap sejumlah sel tumor tertentu. (Achmad, S.A, 1999). Pada kesempatan ini akan dilaporkan isolasi dua senyawa flavon terisoprenilasi, yaitu kudraflavon C (1) dan artokarpin (2), dari ekstrak metanol kayu batang *A. heterophyllus*. Struktur molekul kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi, serta perbandingan dengan senyawa standar. Pengujian aktivitas sitotoksik dari senyawa-senyawa tersebut terhadap sel murine leukemia

P388, juga telah dilakukan.

2. Percobaan

Umum. Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat ukur titik leleh mikro Fisher-John yang tidak dikoreksi, Spektrum UV dan IR masing-masing diukur dengan spektrofotometer Varian Cary 100 Conc UV-Visible dan Spectrum One Perkin Elmer FTIR. Spektrum ¹H-NMR dan ¹³C-NMR diukur dengan alat spektrometer JEOL ECP400 yang beroperasi pada 400,0 MHz (¹H) dan 100,0 MHz (¹³C). Kromatografi vakum cair (KCV) dan kromatografi radial dilakukan dengan menggunakan silika gel PF₂₅₄, sementara kromatografi lapis tipis (KLT) dikerjakan dengan pelat aluminium berlapis silika gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄, 0,25mm. Semua pelarut yang digunakan adalah yang berkualitas teknis yang didestilasi. Larutan 1,5% Ce(SO₄)₂ dalam 2N H₂SO₄ digunakan sebagai pereaksi penampak noda.

Bahan Tumbuhan. Kayu batang *A. heterophyllus* dikumpulkan dari daerah kecamatan Bayongbong, Kabupaten Garut,

Jawa Barat pada bulan Agustus 2004 dan telah diidentifikasi di Herbarium Bandungense, Departemen Biologi ITB. Spesimen tumbuhan disimpan di herbarium tersebut.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kayu batang *A. heterophyllus* sebanyak 3,5 kg diekstraksi dengan metanol pada temperatur kamar selama 3 kali berturut-turut, menghasilkan 103 gram ekstrak metanol. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dipartisi berturut-turut dengan *n*-heksan (10 g), diklorometan (38 g), etil asetat (40 g), dan ekstrak metanol sisa (15 g). Ekstak diklorometan (38 g) kemudian difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi cair vakum (KCV) mempergunakan eluen *n*-heksan-etil asetat yang secara berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya sehingga diperoleh enam fraksi utama A-F. Fraksi B (5,2 g) difraksinasi lebih lanjut dengan KCV menggunakan eluen *n*-heksan-etil asetat dengan meningkatkan kepolaran, diikuti dengan kromatografi radial (silika gel ; eluen klorofom:metanol (9,5:0,5)) menghasilkan kudraflavon C (**1**)(0,2 g). Dengan metodologi yang sama senyawa artokarpin (**2**) (0,4 g) juga diisolasi dari fraksi A ekstrak diklorometan.

Kudraflavon C (**1**), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning kecoklatan, t.l. 96-98 °C; UV (MeOH) λ_{maks} : 263, dan 316 (bahu)nm; (MeOH + NaOH) λ_{maks} : 269 dan 360 nm; IR (KBR) ν_{maks} : 3373 (OH), 2917 (C-H alifatik), 1650 (C=O), 1620,1563,1463, 1359 (cincin aromatik) cm^{-1} ; 1H -NMR (aseton- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) : 6,39 (1H,s), 3,10 (2H,d, $J = 7,0$), 5,12 (1H, m), 1,42 (3H, s),1,56 (3H, s), 3,34 (2H,d, $J = 7,0$), 5,27 (1H, m),1,77 (3H, s), 1,64 (3H, s), 6,54 (1H,d, $J = 2,2$), 6,49 (1H, dd, $J = 8,4$ & 2,2), 7,16 (1H,d, $J = 8,4$); ^{13}C -NMR (aseton- d_6 , 100 MHz) δ (ppm) : 162,1, 121,4, 183,0, 105,0, 160,0, 111,7, 162,4, 93,4, 157,0, 24,6, 122,7, 132,0, 25,8, 17,8, 22,0, 123,4, 131,4, 25,7, 17,6, 113,0, 157,2, 103,8, 161,4, 108,0, 132,1.

Artokarpin (**2**), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning pucat, t.l 176-178 °C; UV (MeOH) λ_{maks} : 204,279, dan 321 (bahu)nm; (MeOH + NaOH) λ_{maks} : 207,276 dan 360 nm; IR (KBR) ν_{maks} : 3392 (OH), 2959 (C-H alifatik), 1621 (C=O),1455,1352 (cincin aromatik) cm^{-1} .

Evaluasi Biologi. Pengujian sifat sitotoksik dilakukan terhadap sel murine leukemia P-388.

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa **1** diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning kecoklatan dengan titik leleh 96-98 °C. Spektrum UV dalam metanol memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 263, dan 316 (bahu)nm, spektrum ini mengindikasikan suatu flavon dengan kromofor sinamoil yang muncul sebagai pita I (316nm) dan kromofor benzoil yang ditunjukkan oleh pita II (263nm), pita I yang berupa bahu menunjukkan adanya substituen isoprenil pada posisi C-3 di cincin C. Penambahan reagen geser NaOH mengindikasikan bahwa senyawa **1** memiliki gugus hidroksi bebas pada C-4' yang ditunjukkan dengan adanya pergeseran batokromik dari pita I sebesar 44 nm. Spektrum IR dari senyawa ini memperlihatkan gugus fungsi utama dari suatu flavon, dimana gugus -C=O terkonjugasi muncul pada 1650 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C aromatik terlihat pada 1359-1620 cm^{-1} , sementara serapan untuk gugus -OH terlihat pada 3373 (lebar) cm^{-1} , selain itu serapan C-H alifatik tampak didaerah 2917 cm^{-1} yang memperkuat dugaan adanya gugus isoprenil pada senyawa ini. Berdasarkan analisis di atas disarankan bahwa senyawa hasil isolasi adalah suatu flavon yang terisoprenilasi pada posisi C-3. Spektrum 1H -NMR memperlihatkan bahwa senyawa **1** mempunyai tiga proton aromatik pada cincin B yang muncul sebagai sistem ABX pada δ_H 6,54 (1H,d, $J = 2,2$ Hz), 6,49 (1H, dd, $J = 8,4$ & 2,2 Hz), 7,16 (1H,d, $J = 8,4$ Hz). Adanya sinyal-sinyal tersebut menunjukkan bahwa cincin B dari senyawa **1** memiliki substituen -OH pada C-2' dan C-4' sebagaimana lazimnya flavonoid yang berasal dari tumbuhan *Artocarpus*. Adanya sinyal singlet pada δ_H 13,5 adalah karakteristik untuk gugus -OH pada C-5 yang membentuk khelat dengan gugus karbonil pada C-4. Spektrum 1H -NMR senyawa **1** juga memperlihatkan sinyal pada 6,39 (1H, s) yang memberi petunjuk bahwa pada cincin A senyawa **1** tersubstitusi oleh gugus -OH pada posisi C-5 dan C-7 dan empat sinyal metil pada 1,42 (3H,s), 1,56 (3H,s), 1,63 (3H,s), 1,77(3H,s) menunjukkan adanya dua substituen isoprenil pada posisi C-3 dan C-6. Dari analisis spektrum 1H -NMR tersebut, maka dapat disarankan bahwa senyawa **1** adalah 5,7,2',4'-

tetrahidroksi-3,6-diisoprenil-flavon atau kudraflavon C. Bukti lain yang menunjang analisis ini adalah dari spektrum ^{13}C -NMR yang menunjukkan adanya 25 atom karbon, 6 diantaranya adalah karbon jenis oksidasi-aril (δ_{C} 157,0, 157,2, 160,0, 161,4, 162,1, 162,4), satu karbon karbonil pada δ_{C} 183,0, 4 karbon metil (δ_{C} 17,6, 17,8, 25,7, 25,8), serta dua karbon metilen (δ_{C} 24,6, 22,0). Bukti tambahan yang menunjang struktur molekul senyawa **1** adalah dengan membandingkan data spektrum

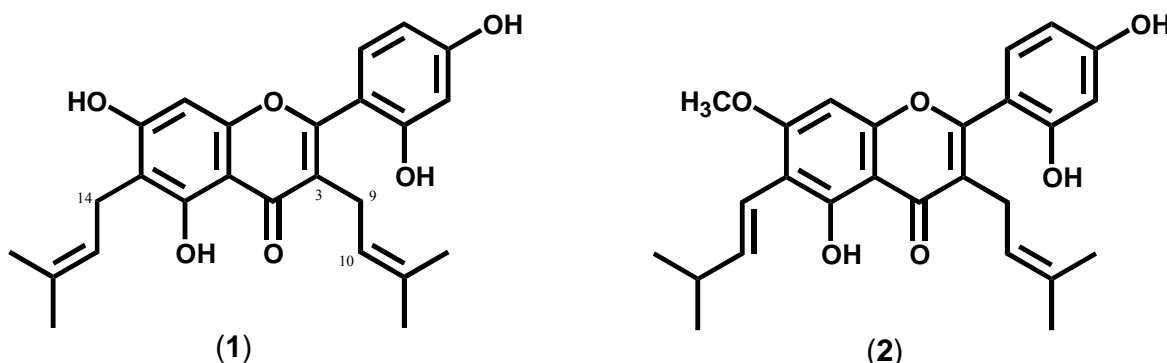
^1H dan ^{13}C NMR dengan data yang sama dari kudraflavon C yang telah dilaporkan sebagaimana dinyatakan pada tabel 1.

Senyawa **2** diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning pucat dengan titik leleh 176-178 $^{\circ}\text{C}$. Spektrum UV senyawa ini dalam metanol memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 321 (bahu) (pita I), dan 279 (pita II) nm. Pola spektrum UV ini mengindikasikan flavon yang terisoprenilasi pada C-3. Penambahan reagen geser NaOH memberikan pergeseran

Tabel 1. Data ^1H dan ^{13}C -NMR Senyawa 1

No	Senyawa 1 (pelarut Aseton-d6)		Kudraflavon C * (pelarut DMSO-d6)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	162,1	-	162,0
3	-	121,4	-	121,5
4	-	183,0	-	183,0
4a	-	105,0	-	105,0
5	-	160,0	-	160,0
6	-	111,7	-	111,8
7	-	162,4	-	162,3
8	6,39 (1H, s)	93,4	6,40 (1H, s)	93,5
8a	-	157,0	-	157,0
9	3,10 (2H, d, $J=7,0$)	24,6	3,12 (2H, d, $J=7$)	24,6
10	5,12 (1H, m)	122,7	5,14 (1H, m)	122,7
11	-	132,0	-	132,0
12	1,42(3H, s)	25,8	1,43(3H, s)	25,8
13	1,56(3H, s)	17,8	1,57(3H, s)	17,9
14	3,34 (2H, d, $J=7,1$)	22,0	3,41 (2H, br d, $J=7$)	22,0
15	5,27 (1H, m)	123,4	5,29 (1H, m)	123,4
16	-	131,4	-	131,5
17	1,77(3H, s)	25,7	1,78(3H, s)	25,8
18	1,64(3H, s)	17,6	1,65(3H, s)	17,6
1'	-	113,0	-	113,1
2'	-	157,2	-	157,2
3'	6,54 (1H, d, $J=2,2$)	103,8	6,57 (1H, d, $J=2$)	103,8
4'	-	161,4	-	161,4
5'	6,49 (1H, dd, $J=8,4$ & 2,2)	108,0	6,52 (1H, dd, $J=8$ & 2)	108,0
6'	7,16 (1H, d, $J=8,4$)	132,1	7,19 (1H, d, $J=8$)	132,3

* Kudraflavon C (Hano Y, *et.al*(1990))



batokromik sebesar 39 nm pada pita I, yang menunjukkan adanya gugus –OH bebas pada posisi C-4' di cincin B. Keberadaan gugus –OH ini didukung oleh spektrum IR senyawa **2** yang menunjukkan adanya serapan pada 3392 cm^{-1} . Spektrum IR senyawa **2** juga memperlihatkan serapan untuk gugus fungsi utama dari suatu flavon yaitu serapan karbonil pada 1621 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C aromatik (1352-1455 cm^{-1}), sementara serapan untuk C-H alifatik terlihat pada 2959 cm^{-1} . Data spektrum IR senyawa **2** tersebut ternyata identik dengan data yang sama dari artokarpin yang sebelumnya telah diisolasi dari tumbuhan *A. champeden* (Hakim, 1998). Bukti tambahan terhadap struktur **2** diperoleh dari hasil perbandingan KLT antara senyawa **2** dengan senyawa artokarpin yang memperlihatkan nilai Rf yang sama pada tiga sistem eluen yang berbeda. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa **2** adalah artokarpin.

Struktur senyawa kudraflavon C (**1**) dan artokarpin (**2**) memiliki jenis kerangka yang sama yaitu 3-prenilflavon, tetapi diantara kedua senyawa tersebut terdapat perbedaan yaitu pada gugus samping yang terikat pada C-7 dan posisi ikatan rangkap pada gugus isoprenil yang terikat pada C-6. Gugus samping pada C-7 dalam senyawa kudraflavon C (**1**) berupa gugus –OH bebas sedangkan pada senyawa artokarpin (**2**) berupa metoksi, kemudian posisi ikatan rangkap pada gugus isoprenil yang terikat pada C-6 dalam senyawa kudraflavon C (**1**) berada diantara C-15 dan C-16 sedangkan pada artokarpin (**2**) berada diantara C-14 dan C-15.

Keberadaan senyawa kudraflavon C (**1**) dan artokarpin (**2**) dalam *Arocarpus*, diindikasikan sebagai prekursor dari sejumlah senyawa turunan flavon terisoprenilasi yang terdapat dalam genus ini. Senyawa-senyawa tersebut sebelumnya telah diisolasi dari beberapa spesies *Artocarpus*, seperti *A. champeden* (Hakim, 1998), *A. glauca* (Agustini, 1999), dan *A. maingayi* (Eliza, 1998). Hal ini menunjukkan kedekatan secara kemotaksonomi antara *A. heterophyllus* dengan *A. champeden*, *A. glauca*, dan *A. maingayi*.

Pada pengujian sifat sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388, senyawa **1** dan **2** memperlihatkan aktivitas yang kuat yang diperlihatkan dengan nilai IC_{50} berturut-turut 3,30 dan 1,9 $\mu\text{g/mL}$. Senyawa **2** juga dilaporkan menghambat transpor asam amino leusin melalui membran usus ulat sutera *bombyx mori*, dengan nilai IC_{50} 3,65 mmol/L (Achmad, 2004).

4. Kesimpulan

Dari fraksi diklorometan kayu batang *A. heterophyllus* telah ditemukan dua senyawa flavon terisoprenilasi, yaitu kudraflavon C (**1**) dan artokarpin (**2**). Hasil uji biologis terhadap kedua senyawa tersebut memperlihatkan sifat sitotoksik yang kuat, menunjukkan bahwa tumbuhan ini berpotensi sebagai sumber bahan kimia yang bermanfaat.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Herbarium Departemen Biologi ITB yang telah mengidentifikasi tumbuhan tersebut.

6. Daftar pustaka

Achmad, S.A. (2004). Review : Empat Puluh Tahun dalam Kimia Organik Bahan Alam Tumbuhan-Tumbuhan Tropika Indonesia : Rekoleksi dan Prospek, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, 35-54.

Achmad, S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin, D., Syah, Y.M., (1999). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam '99*, hal. 1-9.

Agustini, D.M., Makmur, L., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., Hakim, E.H., Syah, Y.M., (1999). *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam '99*, hal .198-204.

Eliza., (1998). *Artokarpin dan Turunannya dari Kayu Akar Artocarpus maingayi King*, Tesis, Departemen Kimia , Institut Teknologi Bandung.

Hakim, E.H., Marlina E.V., Mujahidin, D., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., Makmur, L., (1998). *Proceeding ITB*, 30, 31-36.

Hano, Y., Y. Matsumoto., K. Shinohara., Jin Yun Sun., T. Nomura T., (1990). *Heterocycles*, 31(7),1339-1344.

Jarret F.M. (1959). Studied in Artocarpus and Allied Genera I, General Considerations, *J. Arnold Arboretum*, 40,1-29.

Kesan Rawatan Permukaan Gentian Aramid Terhadap Sifat Mekanik Komposit Getah Asli yang Diperkuat Gentian Aramid

Ishak Ahmad, Chen Kee Cheong

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, MALAYSIA
gading@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Kesan perlekatan antara gentian aramid dan getah asli (NR) telah diukur secara kuantitatif menggunakan kaedah ujian mikro-ikatan. Dua jenis gentian aramid yang digunakan dalam kajian ini adalah gentian tanpa rawatan (HM) dan gentian yang dirawat dengan bahan perekat aktif epoksi (HMA). Kedua-dua gentian tersebut seterusnya dirawat dengan lateks resorsinol formaldehid (RFL) sebelum dititiskan dengan lateks NR. Didapati bahawa rawatan permukaan gentian menggunakan RFL ke atas kedua-dua gentian HM dan HMA telah meningkatkan kekuatan ricih antara muka gentian/matriks. Keputusan ini telah disokong oleh analisis mikroskop imbasan elektron (SEM) ke atas sampel selepas ujian regangan. Keputusan ini memberikan kesimpulan bahawa rawatan permukaan gentian dengan bahan perekat aktif epoksi dan lateks resorsinol formaldehid (RFL) meningkatkan lekatan antara muka antara gentian aramid dan matriks ENR.

Kata kunci : Aramid, getah asli, mikro-ikatan

1. Pendahuluan

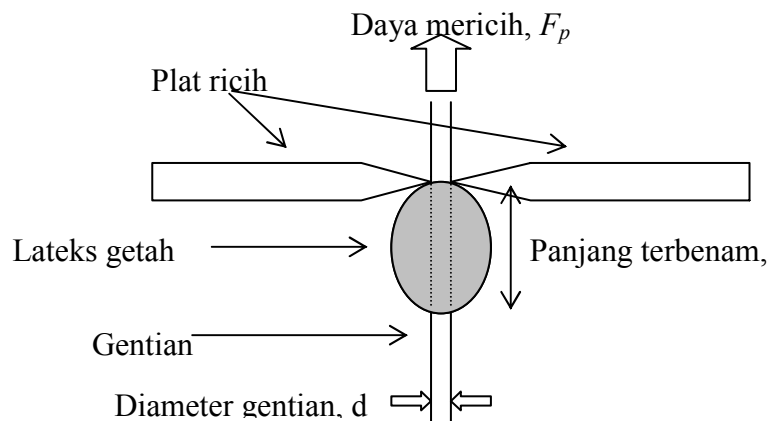
Penambahan pengisi ke dalam matriks getah, plastik ataupun adunan elastomer termoplastik (TPE) secara amnya akan mengubah sifat-sifat asas bahan seperti ketumpatan, kekerasan, kekuatan regangan, kekuatan hentaman, kerintangan kimia dan kebolehprosesan bahan yang terhasil (Wu et al. 1996). Umumnya, gentian memperkuat seperti aramid, kaca atau karbon bertindak sebagai bahagian yang membawa beban manakala matriks di sekelilingnya bertindak sebagai medium pemindah beban dan mengekalkan gentian dalam lokasi dan orientasi yang tertentu. Garbassi et al. (1998) telah menyatakan bahawa perlekatan antara matriks dan gentian memperkuat amat penting bagi membolehkan pemindahan tegasan berlaku secara seragam antara dua fasa yang berbeza. Apabila beban dikenakan ke atas komposit diperkuat gentian maka beban akan dipindahkan daripada matriks kepada gentian melalui antara muka. Dengan

itu kekuatan antara muka akibat lekatan gentian-matriks merupakan parameter yang penting untuk mencirikan sifat mekanik bahan komposit.

Kekuatan ricih antara muka adalah salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur kekuatan mikromekanik komposit. Beberapa ujian telah dibangunkan bertujuan mengukur sifat antara muka gentian-matriks ini (Pitkethly et al., 1993). Antara kaedah pengukuran mikromekanik yang paling popular adalah ujian mikro-ikatan (Gaur & Miller 1989). Hubungan yang melibatkan tegasan ricih antara muka, τ_a , daya tarikan-keluar maksima, F_d , diameter gentian, d dan panjang terbenam gentian di dalam matriks, L_e adalah:

$$\tau_a = \frac{F_d}{\pi d L_e} \quad (1)$$

Miller et al. (1987) menyebut bahawa untuk mendapatkan keputusan yang tepat, panjang



Rajah 1 : Ilustrasi ujian mikro-ikatan

terbenam gentian mestilah sangat pendek bagi mengelakkan gentian putus sebelum nyah-ikatan berlaku dan gentian tertarik keluar daripada matriks.

Dalam kajian ini, kesan rawatan permukaan gentian Twaron terhadap kekuatan antara muka komposit getah asli diperkuat Twaron telah dikaji secara kuantitatif menggunakan ujian mikro-ikatan.

2. Percobaan

Bahan

Gentian aramid yang digunakan dalam kajian ini ialah Twaron 2200. Dua jenis gentian ini adalah Twaron modulus tinggi tanpa rawatan (TNHM) dan Twaron modulus tinggi dengan pengaktif-epoksi (TNHMA). Kedua-dua gentian ini diperolehi dari Akzo Nobel Research Central, The Netherlands. Matriks yang digunakan adalah lateks getah asli yang telah diawet dengan ammonia, kira-kira 0.7% (berat kering). Lateks getah asli ini dibekalkan oleh Lembaga Getah Malaysia.

Larutan resorsinol formaldehid (RF) disediakan dengan menyediakan campuran resorcinol, formaldehid dan natrium hidroksida dengan nisbah mol 1 : 2 : 0.02 dalam keadaan suhu rendah. Manakala RFL disediakan dengan mencampurkan 10 mL RF larutan yang dicairkan dengan 8 mL lateks getah asli dan 10 mL air suling. Campuran tersebut dibiarkan selama 4 jam untuk menghasilkan RFL yang stabil (Job & Joseph 1999). Gentian Twaron dicelup dalam larutan RFL dan kemudian dikeluarkan. Selepas itu gentian dipanaskan dalam vakum oven pada suhu 80°C selama 60 minit dan diikuti pemanasan pada suhu 150°C.

Ujian mikro-ikatan

Lateks getah asli dititikkan pada gentian dengan saiz titisan kira-kira antara 0.25-1.00 mm. Selepas itu gentian tersebut dikeringkan pada suhu bilik selama 3-5 hari. Ujian mikro-ikatan dijalankan menggunakan mesin tegangan model Testometrik mikro 350. Rajah 1 menunjukkan ilustrasi sampel sebelum ujian dijalankan.

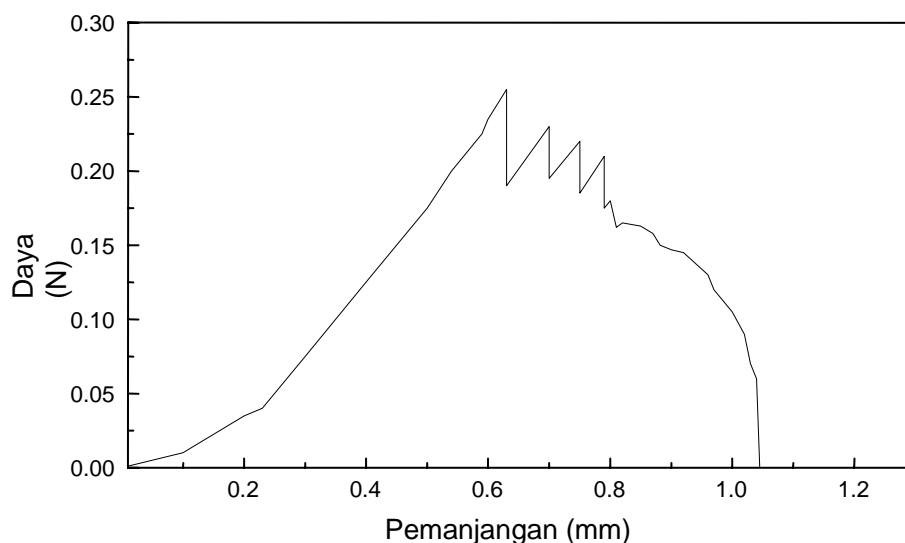
Daya yang diperlukan untuk mericih gentian dari matriks itu dikenali sebagai daya mericik utama, F_d . Untuk setiap spesimen, 15 ulangan ujian telah dijalankan pada panjang gentian yang berbeza. Graf daya melawan pemanjangan dicatatkan seterusnya daya ricihan, F_p , diperolehi menggunakan *Pers. (1)*. Seterusnya hubungan eksperimen antara τ_a dan F_d digunakan untuk mengukur kekuatan ricih antara muka (IFSS), τ_s , dengan mendapatkan τ_a pada paksi-y bernilai kosong (Zhandarov & Pisanova 1997).

$$\tau_a = \lim_{L_e \rightarrow 0} \tau_a \frac{F_d}{A} \quad (2)$$

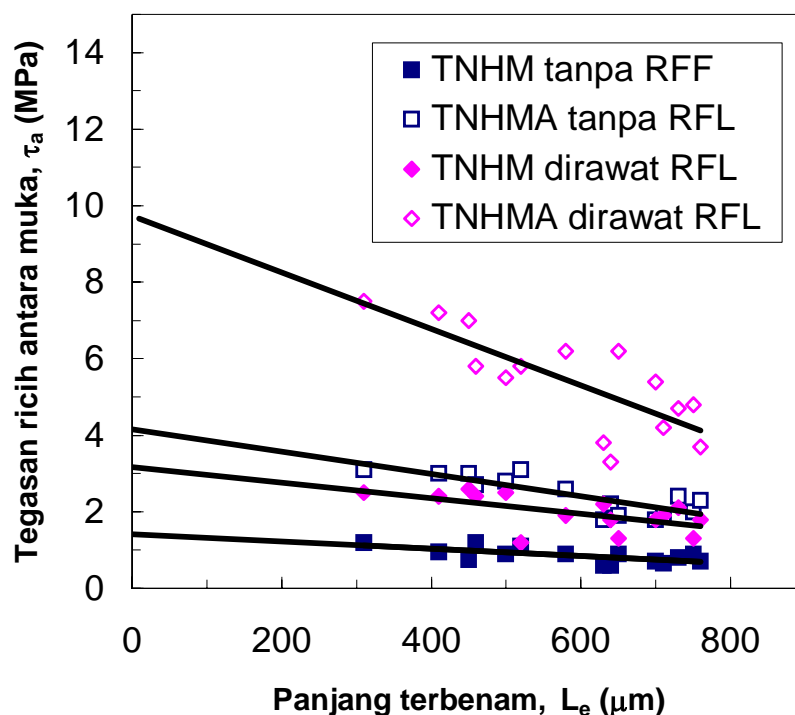
di mana A adalah luas antara muka. Definasi ini menghapuskan semua faktor yang menyebabkan ketidakseragaman taburan tegasan ricih antara muka sepanjang gentian dan hanya mencirikan interaksi gentian/matriks sahaja. Dengan itu IFSS hanya dicirikan oleh kekuatan ikatan antara gentian dan matriks dan tidak bergantung kepada geometri sampel.

Analisis mikroskop imbasan elektron (SEM)

Pemeriksaan morfologi dilakukan menggunakan SEM model Philips XL30.



Rajah 2: Perbandingan plot daya ricih melawan pemañangan untuk TNHMA yang dirawat RFL dan tanpa rawatan RFL



Rajah 3: Perubahan nilai τ_a yang ditentukan menggunakan *Per (1)* pada panjang terbenam berbeza untuk ujian mikro-ikatan Twaron/NR

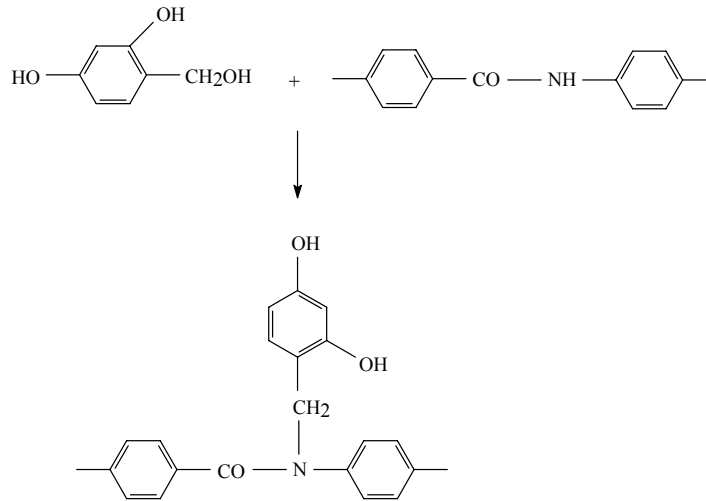
Diameter gentian diukur dengan cara kalibrasi mikrograf SEM. Seterusnya SEM digunakan untuk mengkaji permukaan gentian aramid tanpa rawatan dan selepas dirawat, membandingkan perbezaan di antara permukaan gentian yang tanpa rawatan dan yang dirawat dengan RFL dan interaksi antara permukaan gentian dengan matriks.

3. Hasil dan Pembahasan Ujian mikro-ikatan

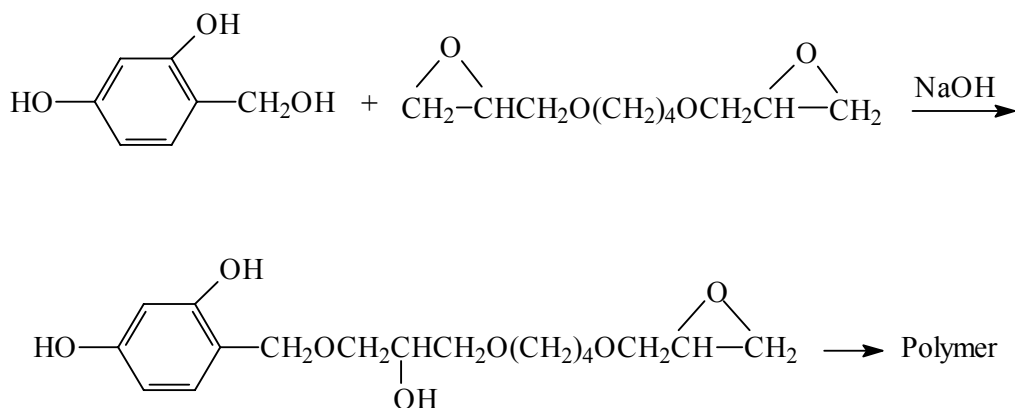
Rajah 2 menunjukkan plot daya melawan pemanjangan daripada ujian mikro-ikatan. Proses nyah-ikatan telah mula dikaji oleh Greszczuk (1966) di mana beliau membuat andaian bahawa daya tarikan keluar maksimum gentian berlaku pada permulaan nyah-ikatan

Jadual 1: Nilai IFSS (τ_s) daripada ujian mikro-ikatan.

Sistem	IFSS (MPa)
TNHM tanpa rawatan	1.4 ± 0.6
TNHMA tanpa rawatan	4.1 ± 1.5
TNHM dirawat RFL	3.2 ± 0.8
TNHMA dirawat RFL	9.7 ± 1.8



Rajah 4: Tindak balas antara RF dan aramid

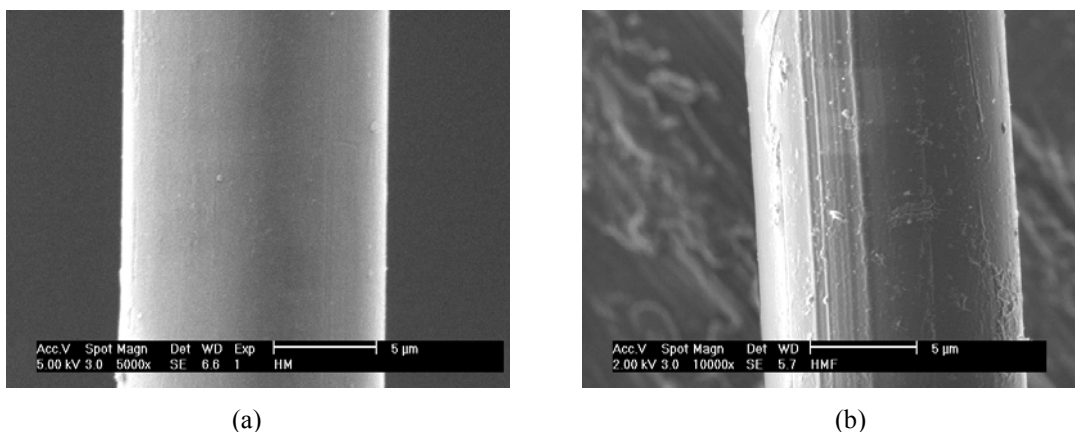


Rajah 5: Cadangan tindak balas antara kumpulan epoksi dan RFL

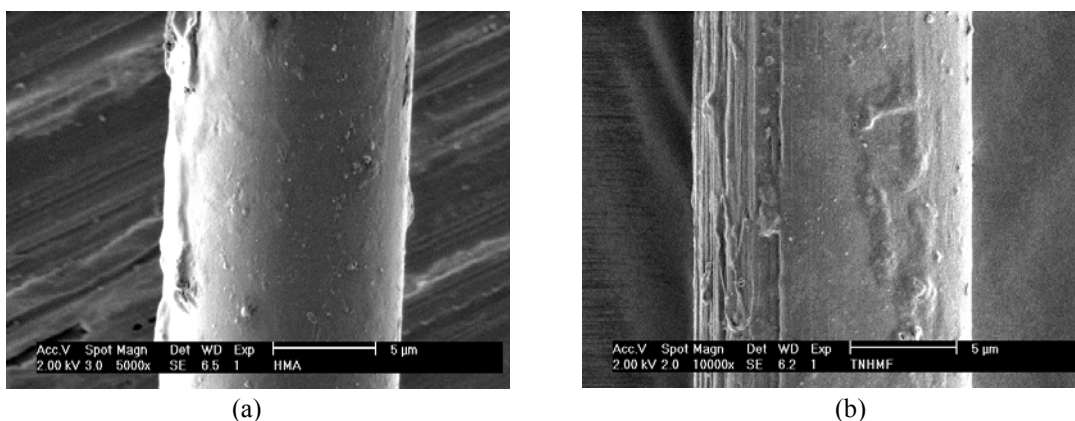
($F_{max} = F_d$). Pengaruh panjang terbenam semasa gentian ditarik keluar daripada matriks juga telah dikaji oleh Pisanova et al. (2000). Beliau menyatakan bahawa IFSS boleh ditentukan pada $L_e = 0$ (*Pers. (2)*) Dengan menggunakan teori ini maka nilai IFSS untuk setiap sistem boleh ditentukan seperti ditunjukkan dalam Rajah 3.

Jadual 1 menunjukkan nilai IFSS yang ditentukan daripada Rajah 3. Didapati bahawa nilai τ_s bagi TNHMA tanpa RFL sangat rendah yang menggambarkan bahawa tiada perlekatan

antara gentian dan matriks dan mekanisma kegagalan adalah nyah-ikatan gentian sepanjang matriks. Sebaliknya TNHMA menunjukkan nilai τ_s yang lebih tinggi. Ini mungkin disebabkan kekasaran permukaan gentian yang meningkatkan ikatan mekanikal gentian-matriks. Rawatan permukaan bahan aktif epoksi pada permukaan gentian juga dijangka membantu memperbaiki interaksi gentian-matriks. Jadual 1 juga menunjukkan kedua-dua TNHMA dan TNHMA yang dirawat dengan RFL mempunyai nilai τ_s yang lebih tinggi berbanding tanpa rawatan RFL.



Rajah 6: Mikrograf SEM permukaan gentian selepas gentian ditarik keluar daripada matriks NR; (a) TNHMH tanpa RFL, (b) TNHMH dirawat RFL



Rajah 7: Mikrograf SEM permukaan gentian selepas gentian ditarik keluar daripada matriks NR; (a) TNHMA tanpa RFL, (b) TNHMA dirawat RFL

Peningkatan kekuatan lekatan TNHMH yang dirawat RFL disebabkan oleh wujudnya tindak balas antara kumpulan metilol pada resin RF dan kumpulan amida pada gentian.

Tindak balas kimia yang dijangka berlaku adalah seperti ditunjukkan dalam Rajah 4. Manakala cadangan tindak balas yang berlaku antara kumpulan epoksi pada permukaan gentian (TNHMA) dan kumpulan metilol daripada RFL ditunjukkan oleh Rajah 5. Kumpulan metilol resorsinol menyebabkan permbukaan gelang epoksi menghasilkan aralkil eter. Kedua-dua tindak balas ini menunjukkan bahawa rawatan gentian dengan RFL akan membantu pembentukan ikatan kimia dan seterusnya memperbaiki lekatan antara muka gentian-matriks. Cadangan tindak balas ini juga menunjukkan TNHMA memberikan perlekatan gentian-matriks yang lebih baik berbanding TNHMH.

Analisis SEM

Rajah 6 dan 7 menunjukkan mikrograf SEM yang diambil bagi sampel TNHMH dan TNHMA yang ditarik keluar daripada matriks NR. Didapati bahawa tiada matriks terlekat pada permukaan gentian bagi gentian TNHMH selepas ditarik keluar. Ini jelas menunjukkan bahawa tidak wujud interaksi antara gentian dan matriks. Mikrograf SEM juga menunjukkan berlaku perubahan yang signifikan terhadap permukaan gentian TNHMH yang dirawat dengan RFL. Rajah 6(b) menunjukkan permukaan gentian semakin kasar yang mungkin diakibatkan oleh geseran pada antara muka berlaku. Pemerhatian ini bersesuaian dengan keputusan IFSS yang ditunjukkan dalam Jadual 1.

Rajah 7(a) pula menunjukkan gentian TNHMA yang ditarik keluar daripada matriks NR semasa ujian mikro-ikatan. Didapati permukaan

gentian diselaputi oleh sedikit fragmen NR. Manakala Rajah 7(b) menunjukkan dengan jelas bahawa matriks terlekat pada bahagian permukaan gentian TNHMA yang dirawat RFL dan keadaan permukaan yang begitu kasar. Ini membuktikan bahawa ikatan antara gentian dan matriks begitu kuat dibandingkan dengan gentian yang tidak dirawat (Jadual 1).

4. Kesimpulan

Penyelidikan ini menunjukkan bahawa gabungan antara ujian mikro-ikatan dan kajian morfologi menggunakan SEM boleh digunakan untuk mengkaji kesan rawatan permukaan gentian Twaron ke atas kekuatan antara muka komposit Twaron/NR. Kajian menunjukkan bahawa TNHMA memberikan nilai IFSS yang lebih tinggi berbanding TNHM yang bermaksud rawatan dengan bahan aktif epoksi telah meningkatkan interaksi gentian-matriks. Seterusnya rawatan permukaan Twaron menggunakan RFL juga menunjukkan bahawa berlaku peningkatan interaksi antara gentian dan matriks berbanding gentian tanpa rawatan RFL. Keputusan ini membolehkan kesimpulan dibuat bahawa kedua-dua rawatan permukaan iaitu bahan aktif epoksi dan RFL telah meningkatkan kekuatan antara muka gentian Twaron dan getah asli.

5. Penghargaan

Pengarang ingin merakamkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (MOSTI) kerana memberikan bantuan melalui geran penyelidikan IRPA iaitu 09-02-02-0092-EA237 dan Universiti Kebangsaan Malaysia.

6. Daftar Pustaka

Gaur U. & Miller B. (1989). Microbond method for determination of shear strength of a fibre/resin

interface: Evaluation of experimental parameters. *Compos Sci & Technol*, **34**, 35-51.

Greszczuk LB. (1966). Theoretical studies of the mechanisms of the fibre-matrix interface in composites in 'Interface in Composites' ASTM STP;**452**, 42-59.

Job L. & Joseph R. (1999) Studies on Rubber-to-Nylon Tire Cord Bonding. *J Appl Polym Sci.*, **71**, 1197-1202.

Miller B., Muri P., Rebenfeld L. (1987). A Microbond method for determination of the shear strength of a fibre/resin interface. *Compos Sci Technol*, **2**, 17-32.

Nielsen L.E. & Landel R.F. 1994. *Mechanical properties of polymer and composites*. New York: Marcel Dekker Inc.

Pisanova E., Zhandarov S., Mader E., Ahmad I., Young R.J. (2001) Three techniques of interfacial bond strength estimation from direct observation of crack initiation and propagation in polymer-fibre systems. *Compos. Part A: Appl. Sci. & Manu.* **32A**, 435-443.

Pitkethly M.J., Favre J.P., Gaur U., Jakubowski J., Mudrich S.F., Caldwell D.L., Drzal L.T., Nardin M., Wagner H.D., Di Landro L., Hampe A., Armistead J.P., Desaegeer M., Verpoest I. (1993). A round robin programme on interfacial test methods. *Compos Sci & Technol*, **48**, 205-214.

Wu S.R., Sheu G.S., Shyu S.S. (1996). Kevlar fibre-epoxy adhesion and its effect on composite mechanical and fracture properties by plasma and chemical treatment. *J Appl Polym Sci.*, **62**,1347-1358.

Zhandarov S.F. & Pisanova E.V. (1997). The local bond strength and its determination by fragmentation and pull-out tests. *Compos. Sci. & Technol.*, **57**, 957-964.

A Comparison of Two SPE Cartridges Use for the Extraction of Fluroxypyr from Soil

Ismail B. S.¹⁾ Tan Y. A. and Halimah Muhammad²⁾

¹⁾ School of Environmental and Natural Resource Sciences,
Faculty of Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM, Bangi, Selangor, Malaysia.
e-mail: ismail@pkrisc.cc.ukm.my

²⁾ Malaysian Palm Oil Board, Persiaran Institusi,
Bandar Baru Bangi, 43600 Kajang, Selangor, Malaysia.
e-mail: halimah@mpob.gov.my

Abstract

The purpose of this study is to compare two SPE cartridges used for extracting fluroxypyr in the soil. The proposed methods involve two steps: solid-liquid extraction followed by cleaning-up process. Fluroxypyr in the soil samples was extracted into an acetonitrile layer and eluted through one of two types of polyvinyl dibenzene solid phase extraction (SPE) cartridges (IST ISOLUTE ENV⁺ or OASIS[®] HLB) for additional clean up. Quantification of the extracted fluroxypyr was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) including a diode array detector. The HPLC detector response was tested with standard solutions containing 0.4 to 5 µg/ml fluroxypyr. A standard calibration curve where $r^2 = 0.9995$ ($p < 0.05$) was obtained. The minimum detectable concentration was 1 µg/kg. Using OASIS[®] HLB, the average recovery rate of fluroxypyr from soil spiked with 1, 5, 10, 25 or 50 µg/kg fluroxypyr was 107±0.5%, 100±4.7%, 101±2.5%, 100±0.7% and 82±0.9%, respectively. Meanwhile, using IST ISOLUTE ENV⁺, the recovery rate of fluroxypyr from the spiked soils containing 1, 5, 10, 25 or 50 µg/kg of the fluroxypyr was 91±8.0%, 94±6.8%, 93±6.2%, 90±6.5% and 103±9.0%, respectively. The method developed proved to be suitable for determination of fluroxypyr in soil samples and is recommended for the monitoring of fluroxypyr contamination of the environment. Based on the percentage recovery and relative standard deviation, the method using OASIS[®] HLB appeared to be better than the one using IST ISOLUTE ENV⁺ for the extraction of fluroxypyr in soil.

Key words: Fluroxypyr, IST ISOLUTE ENV⁺, OASIS[®] HLB, SPE Cartridge, Soil.

1. Introduction

Fluroxypyr is an extremely effective post emergence herbicide used for control of economically important broadleaf weeds in cereal grain crops, corn, pasture, and other crops, as well as for non- crop uses (Lehmann and Miller, 1989; Lehmann *et al.*, 1993). Fluroxypyr is the common name for 4-amino-3, 5-dichloro-6 fluro-2pyridinyloxy acetic acid, (C₇H₅Cl₂FN₂O₃) sold under the trade name of Starane[®]. It is grouped under the pyridyloxyacetic acid weedicides and is a colorless crystal with a melting point of 232-

233°C and low solubility in water, about 0.9 µg/L at 27.7°C (Worthing, 1987; Kidd and James, 1991; Lehmann *et al.*, 1996). It can be used individually or in combination with other herbicides. There are limited reports on the extraction of fluroxypyr from soil and water samples in the environment. Lehmann *et al.* (1996) had studied the rate of hydrolysis of fluroxypyr-MHE in environmental samples of water and soil by using high performance liquid chromatography (HPLC). Johnson and Hall (1996) however used an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for

quantification of fluroxypyr in soil and water samples. The objective of this study is to determine the efficiency of the SPE cartridges namely OASIS[®] HLB and IST ISOLUTE ENV⁺ in the cleaning process of fluroxypyr extracts from soil samples.

2. Experimental

Reagents

All reagents and solvents used in this study were of analytical grade. Acetonitrile, methanol, acetic acid and acetone were obtained from Merck and standard fluroxypyr of 99.7% purity was purchased from the Laboratories of Dr. Ehrenstorfer Co. Germany. Solid phase extraction (SPE) OASIS[®] HLB (polyvinyl dibenzene) containing 200 mg of sorbent were obtained from WATERS (USA). The ISOLUTE ENV⁺ containing 200 mg sorbent was obtained from International Sorbent Technology (IST), MidGlamorgan UK.

Apparatus

The pH meter model used was a PHM 210, Radiometer, from Copenhagen. A vacuum manifold, IST VacMaster was purchased from International Sorbent Technology (IST). The aspirator connected to the vacuum manifold, a Buchi B-169 Vacuum N-Evap Model 1111, used to evaporate the solvent, was purchased from Organomation Associates Inc. USA.

HPLC Conditions

An Agilent HPLC 1100 Series fitted with a diode array detector (DAD) of wavelength 254 nm was used. The column used was a LUNA RP18, 5 μ m, (250mm X 4.6mm I.D.). The mobile phase was acetonitrile and acetate buffer, (1% acetic acid in water) often in the ratio of 60:40. The flow rate and injection volume were 0.8 ml/ min and 100 μ l respectively.

Methodology

Twenty grams of fluroxypyr-free soil samples in 250 ml conical flasks were spiked with fluroxypyr standard at the following concentrations: 1, 5, 10, 25 or 50 μ g/kg. Eighty-ml of acetone: water (95:5) was then added to each conical flask and the mixture was again mixed thoroughly for 30 sec on the vortex mixer. Each conical flask was placed in the ultra sonic bath for 15 min, and then the contents were transferred into test tubes and centrifuged on high speed (3,500 rpm) at 26°C

for 10 min. The top layer (acetone + water) was transferred to a Schott bottle using a glass Pasteur pipette and 200 ml of fluroxypyr-free water were added. The bottles were then closed and the contents mixed by shaking for a few seconds. The contents were then kept on an ultrasonic bath for 5 min and the pH of the mixture adjusted to pH 3.0. A SPE cartridge was attached to the manifold, which was pre-washed with 3 ml acetonitrile and 3 ml distilled water. The washings were then discarded. The SPE tubing was immersed into the mixture and the aspirator was switched on for the water to be sucked through either IST ISOLUTE ENV⁺ or OASIS[®] HLB. After the water was completely drawn through the SPE cartridge, the cartridge was vacuum-dried. Fluroxypyr adsorbed in the cartridge, was then eluted with 4 ml acetonitrile. The elute was dried completely using vacuum. The residue was then redissolved with 1 ml acetonitrile before being injected into the HPLC – DAD.

3. Results and Discussion

Figure 1 shows the calibration data obtained by triplicate analysis, with each solution being injected thrice. The linear regression (R^2) was found to be 0.9986 and the equation derived from the calibration area data was $y = 202.87x + (-7.0509)$, where y is the area of fluroxypyr obtained from the HPLC analysis and x the concentration of fluroxypyr in μ g/mL. The reproducibility and linearity of the injection technique are acceptable.

The efficiency of the method was tested by adding known amounts of fluroxypyr to soil which was not contaminated with any fluroxypyr residue. The recovery of fluroxypyr was determined by analyzing the soil samples spiked with the fluroxypyr standard solution at 5 different levels viz. 1, 5, 10, 25 or 50 μ g/kg (Figure 3). The recovery of fluroxypyr was determined after the clean-up process with the SPE cartridge of either OASIS[®] HLB or IST ISOLUTE ENV⁺. The recovery and relative standard deviation of fluroxypyr spiked in soil samples at levels of 1, 5, 10, 25 or 50 μ g/kg using OASIS[®] HLB were 107 \pm 0.5%, 100 \pm 4.7%, 101 \pm 2.5%, 100 \pm 0.7% and 82 \pm 0.9%, respectively with relative standard deviation of 0.5% to 4.7%. When the soil was spiked with fluroxypyr at 1, 5, 10, 25 or 50 μ g/kg the recovery was 91 \pm 8.0, 94 \pm 6.8, 93 \pm 6.2, 90 \pm 6.5 and 103 \pm 9.0%, respectively

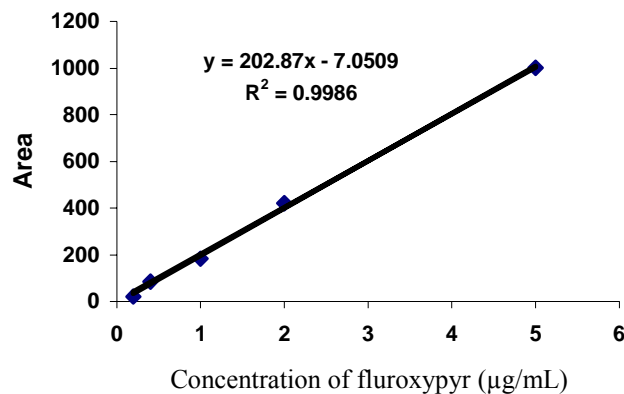


Figure 1: Calibration curve of standard fluroxypyr against high performance liquid chromatography peak area (HPLC-DAD)

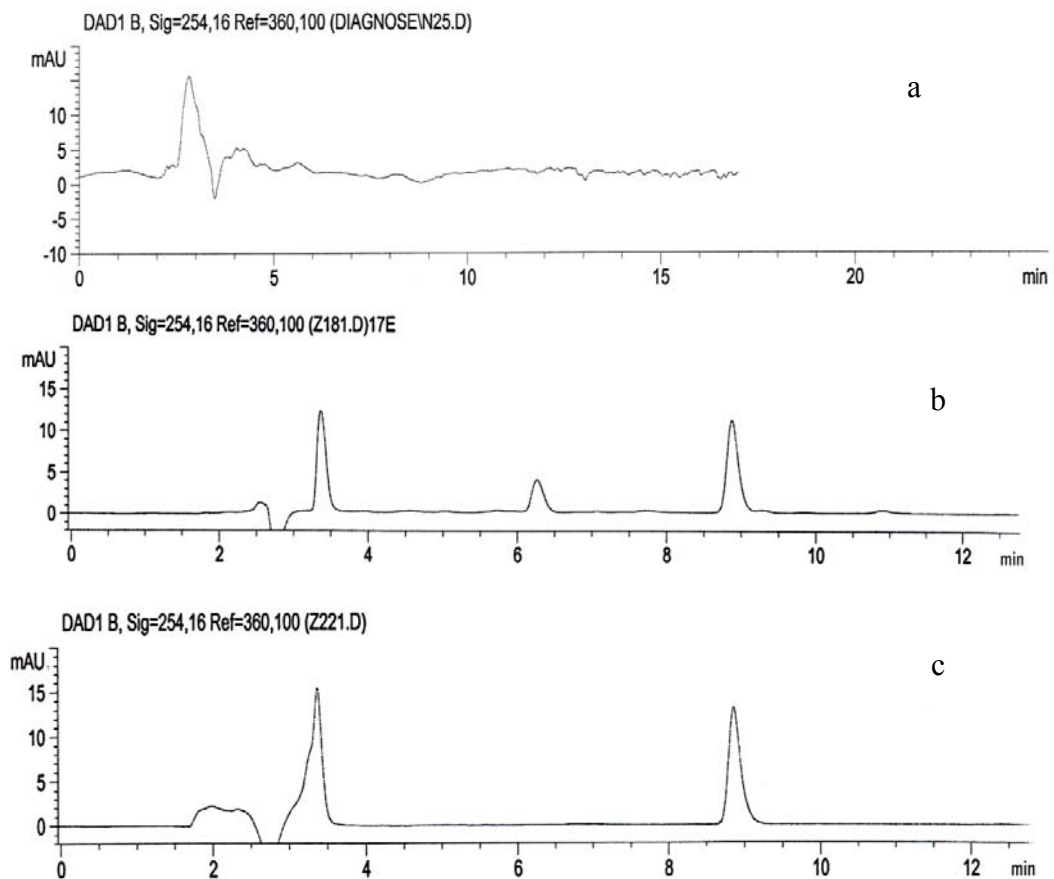


Figure 2. HPLC chromatograms for a) blank soil sample, b) fluroxypyr standard solution (0.02 µg/ml), c) spiked soil sample (0.05 µg/kg).

when IST ISOLUTE ENV⁺ was used in the clean up process. The relative standard deviation ranged from 6.2% to 9.0%.

This result shows that in general the recovery was greater when OASIS[®] HLB was used as compared to IST ISOLUTE ENV⁺. The lower value of the relative standard deviation of the

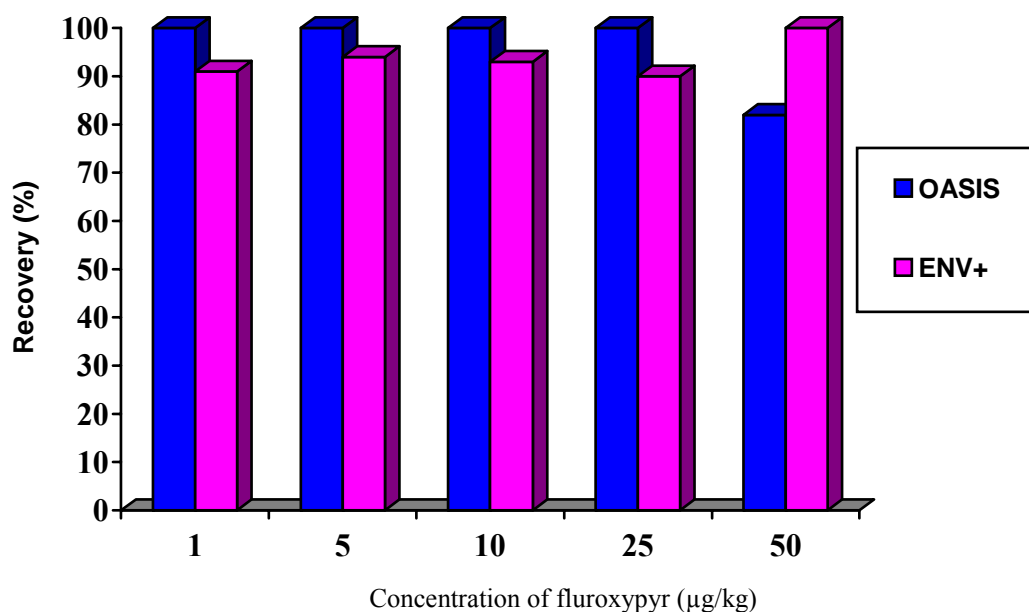


Figure 3: Recovery of fluroxypyr in spiked soil samples using either IST ISOLUTE ENV⁺ or OASIS[®] cartridge.

recovery clearly indicates that OASIS[®] HLB is more accurate as compared to IST ISOLUTE ENV⁺. This finding is in line with a previous report, whereby OASIS[®] HLB had shown good recovery in determining the fluroxypyr residue in soil samples (Halimah *et al.*, 2004).

4. Acknowledgement

The work was supported by research grant IRPA 08-02-02-0011 EA185 from the Ministry of Science, Technology and Innovation of Malaysia.

5. References

Halimah Muhamad, Tan Y. A., Ismail B. S. (2004). Method development for determination of fluroxypyr in soil. *J. Environ. Sci. Health B39* (5), 765-777.

Johnson, B.D., Hall, J.C. (1996). Fluroxypyr-and triclopyr-specific enzyme-linked immunosorbe

assays: Development and quantitation in soil and water. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 488-496.

Kidd, H., James, D.R. (1991). The Agrochemicals Handbook A0791/Aug 91, 3rd edition. Unwin Brothers Limited. Old Woking, Surrey.

Lehmann, R.G., Miller J.R. (1989). Soil catalysed hydrolysis of fluroxypyr-methylheptyl ester. *Weed Res.*, 29, 385-389.

Lehmann, R.G., Miller, J.R., Cleveland, C.B. (1993). Fate of fluroxypyr in water. *Weed Res.* 33, 197-204.

Lehmann, R.G., Miller, J.R., Olberding, E.L., Tillotson, P.M., Laskowski, D.A. (1996). Degradation under laboratory and greenhouse conditions *Weed Res.* 30, 375-382.

Worthing, C.R. (1987). The Pesticide Manual – A World Compendium. 8th Edition. British Crop Protection Council. 179-180.

Synthesis of KSbO_3 -type Structure Metal Oxides

Ismunandar, Hefill Hardiman, and M Hasan Abadi

Departemen Kimia, FMIPA, ITB
Jl. Ganesa 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: ismu@chem.itb.ac.id

Abstract

Several KSbO_3 -type metal oxides have important applications, such as in electrocatalysis. Based on the composition of $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$, two oxides with composition of $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ were chosen as target. Both solid state reaction and hydrothermal methods were used to prepare the compounds. Powder X-ray diffraction patterns of the solid state reaction products indicated that only $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ adopted KSbO_3 structure. The milder method, hydrothermal reaction, using various reactants and reactions conditions was then used to prepare $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$. In the hydrothermal method; CaCO_3 , Bi, PbO_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Bi_2O_3 and Sb_2O_3 were used as reactant, KOH mineralizer concentration were varied from 0.5 to 4 M and reaction time were varied from 24 to 72 hours. Powder diffraction patterns of the hydrothermal reaction products showed that the obtained oxides adopted fluorite type structure.

Keywords: bismuth oxide, X-ray powder diffraction, hydrothermal, solid state reaction, lead oxide.

1. Introduction

KSbO_3 -type metal oxides are of considerable importance as heterogeneous catalysts, such as for electrocatalysis and oxygen ion conductivity (1, 2). These oxides, with general formula of $\text{M}_3\text{M}'_3\text{O}_{11}$ and their variant crystallise at $\text{Pn}3$ space group with cubic cell parameter of 10 Å. High resolution structural studies of these oxides reported the detail and clearer structure description of these materials (3-5). The structure can be described as two interpenetrating networks: a $\text{M}'_2\text{O}_9$ array of edge-sharing octahedra and a Bi_2O_3 array of corner-sharing Bi_8O_4 stellae quadrangulae, Figure 1.

These studies also reported that the atomic displacement parameters (ADP) of M type cations are both large and anisotropic. The cause of these features was resolved in the temperature dependent neutron powder diffraction (6). This later study confirmed that large and anisotropic ADP observed in these materials is a consequence of the local geometry of the atoms. In the case of M atoms

the geometry allows for disorder about threefold axis and yields meaningful ADP.

This work is part of an ongoing study of synthesis and structural of KSbO_3 type oxides. Based on the composition of $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ (7), two oxides with composition of $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ were chosen as target. The milder methods, hydrothermal reaction, were employed for $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ since the solid state reaction give mixture of phases.

2. Experimental

Firstly, $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$, $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ were prepared by the solid state reaction of stoichiometric amounts of Bi or Bi_2O_3 , Sb or Sb_2O_3 or Sb_2O_5 , K_2CO_3 , and PbO. All the reactant were 99,9 % purity or higher. Detail of the solid state reaction has been published (8).

For preparation of $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ using hydrothermal methods, K_2CO_3 , PbO, PbO_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Bi_2O_3 and Sb_2O_3 were used. In the synthesis of

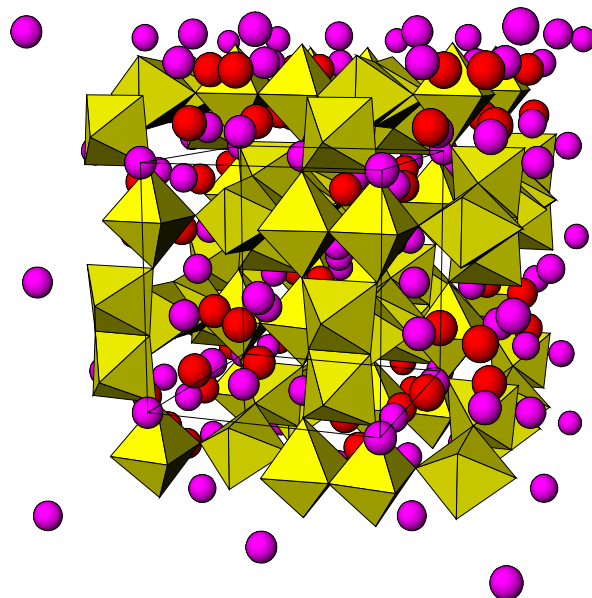


Figure 1. $\text{K}_2\text{Sb}_2\text{O}_7$ structure showing SbO_6 edge shared octahedra, red and purple spheres represent K and O.

Table 1. Reactants and reactions conditions employed in the preparations of prepare $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ via hydrothermal methods.

Reactants	Mineralizer Conc. (M)	Heating schedule		Products
		Temp ($^{\circ}$)	Time (hrs)	
$\text{K}_2\text{CO}_3\text{-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$	0,5	100	24	No reaction
		200	24	Mixture phases
	1	100	24	No reaction
		200	24	Mixture phases
		200	72	Mixture phases
		200	72	Flourite type
$\text{PbO-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$	0,5	200	72	Mixture phases
	1	200	72	Mixture phases
	2	200	72	Flourite type
$\text{PbO}_2\text{-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$	1	200	72	Mixture phases
	2	200	72	Flourite type
	3	200	72	Mixture phases
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$	1	200	72	Mixture phases
	2	200	72	Mixture phases
	3	200	72	Flourite type

$\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ stoichiometric mixture of K_2CO_3 , Bi_2O_3 and Sb_2O_3 with molar ratio of 1 : 2 : 3 and for $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ mixture of $\text{PbO-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$, $\text{PbO}_2\text{-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$ and $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$ in molar ratio of 4 : 1 : 3 were employed. In each case the mixture was introduced into an *autoclave*. Mineralizer, KOH, in various concentration was then added. The autoclave was heated in

the oven. Synthesis details are given in Table 1. Greater detail of the synthesis has been published (9).

X-ray powder diffraction patterns were recorded using $\text{Cu K}\alpha$ radiation in the range $2\theta = 10\text{-}90^{\circ}$ and $0,05^{\circ}$ step size. Cell parameters were determined using Le Baile method implemented in Reitica (10).

3. Results and Discussion

Powder diffraction patterns of the solid state reaction products showed that only $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ adopt KSbO_3 type structure. The reaction mixture $\text{K}_2\text{CO}_3 - \text{Bi} - \text{Sb}_2\text{O}_3$ produced rutile type BiSbO_4 and Sb_6O_{13} , while both reaction mixture $\text{PbO} - \text{Bi} - \text{Sb}_2\text{O}_3$ and $\text{PbO} - \text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{Sb}_2\text{O}_3$ produced $\text{Bi}_3\text{Pb}_4\text{Sb}_5\text{O}_{21}$ and PbSb_2O_6 . Powder diffraction pattern and its Le Baile analysis plot for $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ are given in Figure 2. Le Baile plot showed that $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ adopt KSbO_3 structure with cell parameter of $9.501(2) \text{ \AA}$, in good agreement with previous result (7). This result indicate that both the melting route (7) and solid state reaction resulted in an identical product. As ion KSbO_3 structure, the obtained phases in $\text{K}_2\text{CO}_3 - \text{Bi} - \text{Sb}_2\text{O}_3$ and $\text{PbO} - \text{Bi} - \text{Sb}_2\text{O}_3$ reaction mixtures, i.e. rutile BiSbO_4 and PbSb_2O_6 , have octahedra networks. There are differences in the connection of octahedra: in KSbO_3 octahedra share their edges, in rutile the octahedra are sharing their edges and corners, while in pyrochlore the octahedra share only their corners. Thus presumably, the change of cations result in the different stability of the octahedra connectivity.

As the solid state reaction did not result in the KSbO_3 type structure as targeted, milder methods then were employed. Hydrothermal method can often produced the meta-stable compound. The products of the hydrothermal

reaction are given in Table 1. In general, it could be seen that at mineralizer concentration higher than 2 M and reaction time 72 hours, the single phase product could be obtained. Typical powder diffraction pattern of the hydrothermal product is given in Figure 3. All the oxides gave the powder diffraction patterns characteristic of flourite type structure. From Le Baile analysis it could be concluded that the cell parameters were about $5,2 \text{ \AA}$. Their empirical formula and structure of the obtained phase need to be established further.

In summary, only $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ could be synthesized using the solid state reaction and confirmed to have KSbO_3 structure. Two other target oxides with composition of $\text{KBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ and $\text{Pb}_2\text{BiSb}_3\text{O}_{11}$ could not be prepared both using the solid state reaction and hydrothermal reaction. The products of solid state reaction were BiSbO_4 and Sb_6O_{13} for $\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{Sb}_2\text{O}_3 - \text{K}_2\text{CO}_3$, while both reaction mixture $\text{PbO} - \text{Bi} - \text{Sb}_2\text{O}_3$ and $\text{PbO} - \text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{Sb}_2\text{O}_3$ produced $\text{Bi}_3\text{Pb}_4\text{Sb}_5\text{O}_{21}$ and PbSb_2O_6 . The hydrothermal method did not result in the KSbO_3 type structure either, instead flourite type structure were obtained. This work implies that there is an important factor that determine the stability of the KSbO_3 type structure. It is well known that KSbO_3 type structures have relatively narrow stability. $\text{Bi}_3\text{Ru}_3\text{O}_{11}$ for example transforms into $\text{Bi}_2\text{Ru}_2\text{O}_7$ pyrochlore structure on heating at $1000 \text{ }^\circ\text{C}$. To further characterize

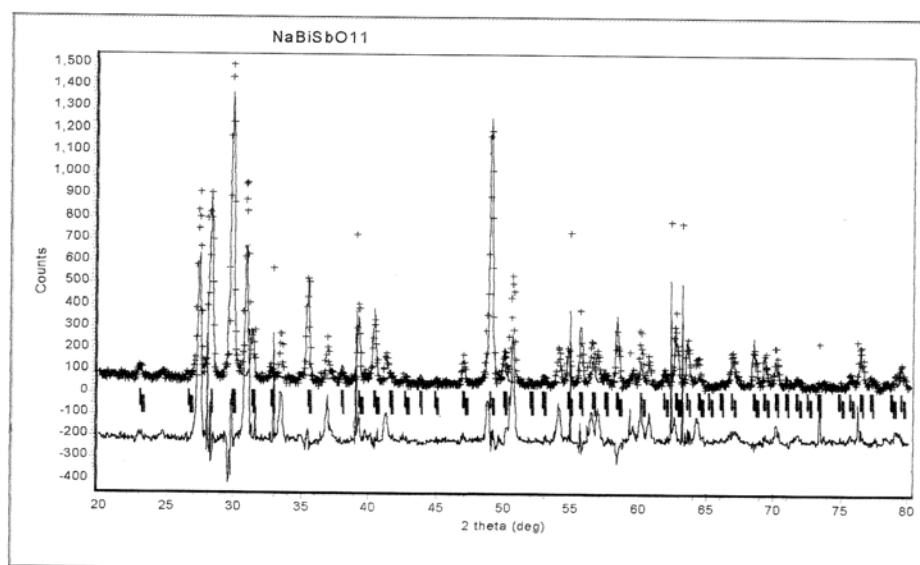


Figure 2. Le Baile refinement profile for $\text{NaBi}_2\text{Sb}_3\text{O}_{11}$ indicated that KSbO_3 type structure was adopted.

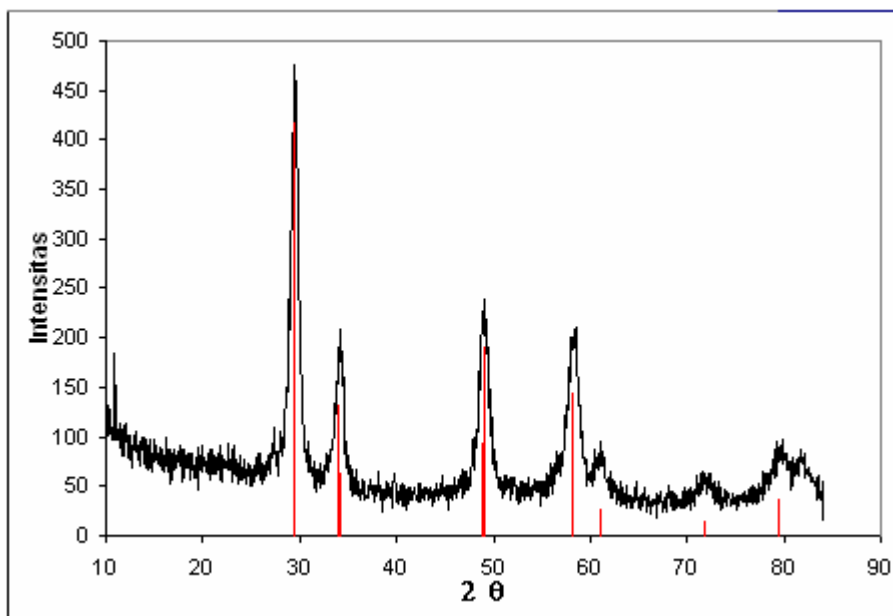


Figure 3. Typical powder diffraction pattern of hydrothermal product, in this case reaction of $\text{PbO}_2\text{-Bi}_2\text{O}_3\text{-Sb}_2\text{O}_3$, KOH 3 M for 72 hours. The red lines showed the diffraction pattern for HoTa_3O_7 a defect fluorite oxides, space group $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$.

this factor, atomic simulation will be used. The result will be published in due course.

4. Acknowledgments

This work is supported by Hibah Bersaing X, TWAS Research Grant, and Departemen Kimia ITB. The assistance of staffs at Departemen Teknik Kimia ITB and Departemen Fisika ITB in recording powder X-ray diffraction is greatly appreciated.

5. References

1. Trasatti, S., Ed., *Electrodes of Conductive Metallic Oxides*, Elsevier, Amsterdam, 1980.
2. Manoharan, R., Goodenough, J. B., *J. Electrochem. Soc.*, **137**, 910, 1990.
3. Ismunandar, Kennedy, B. J., and Hunter, B. A., *J. Solid State Chem.* **127**, 178, 1996.
4. Facer, G. R., Elcombe, M. M., Kennedy, B. J., *Aust. J. Chem.*, **36**, 507, 1983.
5. Abraham, F., Trehoux, J., Thomas, D., *J. Less. Common Met.*, **63**, P57, 1979.
6. Ismunandar, Hunter, B. A. and Kennedy, B. J., *Solid State Comm.*, **108**, 649, 1998.
7. Champarnaud, J. C.-Mesjard; Frit, B., *Eu. J. Solid State Inorg. Chem.* **32**, 493-504, 1995.
8. Hardiman, H., Skripsi, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 2000.
9. Abadi, M. H., Skripsi, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 2003.
10. Howard, C. J. and Hunter, B. A. , 1998 *A Computer Program for Rietveld Analysis of X-Ray and Neutron Powder Diffraction Patterns* (NSW, Australia: Lucas Heights Research Laboratories) 1-27.



Chemical Differences and Similarities of Malaysian *Acronychia pedunculata*

Jalifah L.^{1*}, A. Latiff. M.², Noor Hapeedah M.A.¹, Hairul, M.¹, Darmiwati, R.¹, Hasrina, H.¹, Norhafipah, M.¹, Yana M. Syah³, Euis H. Hakim³

¹School of Chemical Sciences & Food Technology, Faculty of Science & Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

²School of Environmental and Natural Sciences, Faculty of Science & Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

³Natural Product Chemistry Group, Department of Chemistry, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

(*author of correspondence : jali@pkriscc.ukm.my)

Abstract

Acronychia pedunculata (*Mentua Keminiyan*) is one of the species of Rutaceae that has been taxonomically classified as *Acronychia laurifolia*, *A. arborea*, and *A. resinosa*. This plant is widely distributed throughout the tropical countries of Asia. Literature search has reported an extensive chemical investigation on several parts of this plant that led to the isolation of alkaloids, coumarins, terpenes, acetophenones derivatives and lignans. Our on-going phytochemical work on Malaysian *A. pedunculata* has spotted some differences and similarities on the chemical contents of this local species. In this paper, we will discuss the chemosystematics of Malaysian *A. pedunculata*.

Keyword : *Acronychia pedunculata*, *furoquinolines*, *acetophenones*, *chemotaxonomy*

1. Introduction

Acronychia pedunculata (Rutaceae) is a tree that grows up to 30 m high and widely distributed throughout Peninsular Malaysia (Ridley 1967). This plant has been taxonomically classified as *Acronychia laurifolia*, *A. arborea*, and *A. resinosa*, and were used traditionally to treat skin problems, stomachic and as a pain killer (Burkill 1966).

Previous studies on *A. pedunculata* and *A. laurifolia* have reported the isolation of alkaloids (De Silva et al. 1979; Kumar et al. 1989; Cui et al. 1999), coumarins (Rahmani et al. 1996), terpenes (Arthur et al., 1966; Kumar et al. 1989; Rahmani et al. 1996), acetophenones derivatives (Banerjee and Chattajee 1973; Kumar et al. 1989; De Silva et al. 1991; Sy & Brown, 1999) and lignans (Cui et al. 1999) from several different parts of *A. pedunculata*. We recently obtained and investigated different parts of Malaysian *A. pedunculata* from Endau-Rompin Forest Reserve, Pahang, and found some differences

as well as similarities on the chemical contents of this local species. We have taken the opportunity to review the distribution of secondary metabolites found in Malaysian *A. pedunculata*.

2. Experimental

Melting point was measured on Gallenkamp and was uncorrected. UV spectra was recorded on Shimadzu UV-160 while IR spectra was obtained with CHCl₃ as the solvent on Perkin Elmer FTIR 1725-X spectrometer. ¹H (400 MHz), ¹³C (100.56 MHz) NMR measurements were carried out on JEOL ECP-400 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm and the coupling constants are given in Hz. Gas chromatography-mass spectra were obtained on a Macromass LCT.

Extraction and isolation

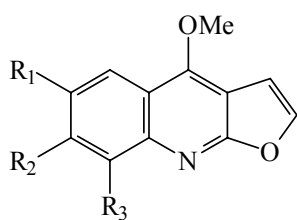
The roots, leaves and barks of *Acronychia pedunculata* were collected from Endau-Rompin Forest Reserve, Pahang and a voucher specimen was deposited at UPM herbarium of

Malaysia. Each part was air-dried, ground and successively extracted with Soxhlet apparatus in petroleum ether, ethyl acetate and ethanol to yield the petroleum ether, ethyl acetate and ethanol extracts. Each crude extract was subjected to Vacuum Liquid Chromatography (VLC) over silica gel 60H using the mixtures of hexane/ethyl acetate and ethyl acetate/ethanol. VLC fractions containing interesting compounds (based on TLC & ^1H NMR) were further purified by either VLC micro-column or chromatotron. Evolitrine (1), kokusaginine (2), skimmianine (3), elimicin (4), octandrenolone (6) and (+)-sesamin (8) were isolated from the leaves part whereas *O*-methyloctandrenolone (7), isoelimicin (5) and kokusaginine (2) were found in the bark. The root parts found to contain bergapten (9), xanthoxyletin (10) and alloxanthoxyletin (11). The structures of isolated compounds were assigned based on comparison of their spectroscopic data with those of literature.

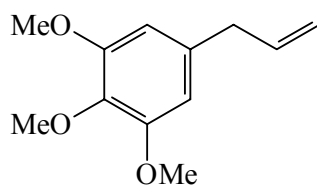
3. Results and Discussion

The main components of Malaysian *A. pedunculata* were furoquinoline alkaloids and dipyranoacetophenones. In addition, phenolic compounds were also obtained consisted of the lignan (+)-sesamin and phenylpropanes; elimicin and iso-elimicin. The other isolates were furo- and pyranocumarins namely bergapten, xanthoxyletin and alloxanthoxyletin (Table 1).

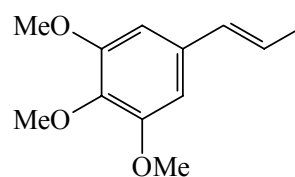
All furoquinoline alkaloids have been documented previously as constituents of plant classified as *A. laurifolia* (Cui et al., 1999) and *A. pedunculata* (De Silva et al., 1979; Kumar et al., 1989). Furthermore, furoquinolines were found to be the most abundant in Malaysian *A. pedunculata* as they occurred in the leaves, roots and barks. In contrast, coumarins were localised in the roots while previous reports identified bergapten and two pyranocoumarins; seselin and norbraylin from the leaves parts of *A. laurifolia* (Rahmani et al., 1996).



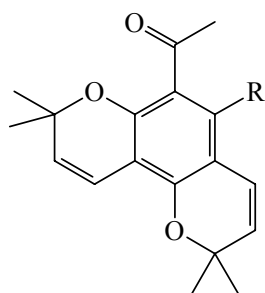
- $R_1 = R_3 = \text{H}; R_2 = \text{OMe}$ (1)
 $R_1 = R_2 = \text{OMe}; R_3 = \text{H}$ (2)
 $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OMe}$ (3)



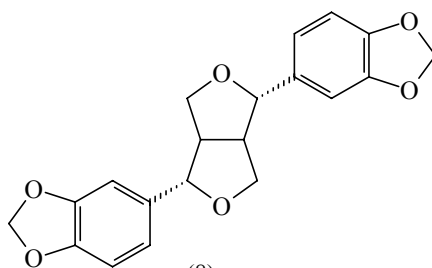
(4)



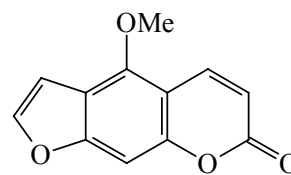
(5)



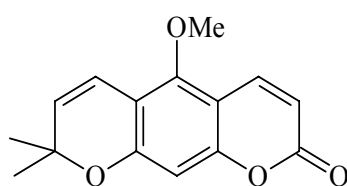
- $R = \text{OH}$ (6)
 $R = \text{OMe}$ (7)



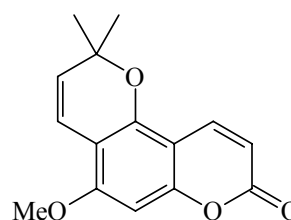
(8)



(9)



(10)



(11)

Table 1: Secondary metabolites isolated from *A. pedunculata* & *A. laurifolia*

Secondary metabolites	<i>A. laurifolia</i> L	<i>A. laurifolia</i> R	B	L	<i>A. pedunculata</i> R	<i>A. pedunculata</i> B	F
Terpenoids							
<i>Mono</i> ~	X			X			
<i>Sesqui</i> ~	X						
<i>Tri</i> ~	X				X	X	
Acetophenones							
<i>Prenylated</i> ~	X			X	X	X	X
<i>Pyrano</i> ~					X		
<i>Dipyrano</i> ~				#		#	
Furoquinolines							
<i>Kokusaginine</i>		X		X, #		#	
<i>Evolitrine</i>		X		#		X	
<i>Skimmianine</i>		X		#	X	#	
<i>Maculosidine</i>		X					
<i>γ-fagarine</i>		X					
<i>Dictamnine</i>					X		
<i>OCH₂O</i> ~		X					
Coumarins							
<i>Furo</i> ~					X, #		
<i>Pyrano</i> ~	X				#		
Lignans		X		#			
Phenylpropanes				#		#	
L – leaves		R – roots		B – barks		F – fruits	
X – compounds isolated from previous study							
# – compounds isolated from this study							

The tetrahydrofuran lignan, (+)-sesamin was isolated from the bark of Malaysian *A. pedunculata*. This finding was consistent with the previous presence of sesamolin and yangambin in the roots of *A. laurifolia* (Cui et al., 1999). Thus, the presence of simple phenylpropanes such as elimicin and iso-elimicin is highly expected.

The types of metabolites so far reported from Malaysian *A. pedunculata* are unequivocal with regards to the association of previous work on *A. pedunculata* and *A. laurifolia*. However, there was a clear dichotomy among acetophenones; this work reported the isolation of dipyranoacetophenones while prenylated acetophenones were encountered in the previous studies either from *A. pedunculata* (De Silva et al 1991; Kumar et al. 1989; Sy & Brown 1999) or *A. laurifolia* (Banerjee and

Chattajee 1973). Apart from the report on the presence of pyranoacetophenone in the root of *A. pedunculata* (Kumar et al. 1989), we observed the leaves and barks of Malaysian *A. pedunculata* contained dipyranoacetophenones.

The presence of dipyranoacetophenones was previously reported from *A. octandra* T. Hartley (previously known as *Melicope octandra* F. Muell.), and this taxon acted as a probable relic of the early stage in the evolution of this genus (Quader et al., 1991). Octandrenolone (6) and its derivatives were also reported from *Melicope erromangensis* (Muyard et al. 1996). It is suggested that dipyranoacetophenones could be formed through cyclisation of the two prenylated chains located in acetophenones such as acrovestone.

From the chemotaxonomic point of view, this chemical evidence supported Hartley's contention that *Melicope* and *Acronychia* were closely allied, despite their separation by Engler in different sub-families according to indehiscent (*Acronychia*) or dehiscent (*Melicope*) nature of the fruits (Hartley, 1981). On the other hand, acridones that were common in both taxa were not detected in this study.

4. Conclusion

Furoquinoline alkaloids and acetophenones found to be the major secondary metabolites in Malaysian *A. pedunculata*. The presence of coumarins, tetrahydrofuran lignans and simple phenylpropanes were also detected. It is perhaps noteworthy that *A. pedunculata*, like other *Acronychia* and its closely allied *Melicope*, was known to produce both furoquinolines and simple acetophenones. However, further investigation has to be done on *A. laurifolia* particularly in looking at the presence of dipyranoacetophenone, to point some affinity between these two taxa.

5. Acknowledgement

The authors wish to thank En. Shamsul (UPM) & En. Isa (UKM) for the plant collection & identification. PUSPA, UKM are highly acknowledged for financial support (NH) during her attachment in ITB.

6. References

Arthur, H. R., Chan, R. P. K., Loo, S. N., Tam, S. W. & Tung, S. (1966). New Alkaloids from Hong Kong Plants. *Phytochem.* **5**, 379-383.

Baneerji, J. R. N. & Chattajee, A. (1973). Acetophenones from *Acronychia laurifolia*. *Indian J. Chem.* **11** : 693.

Burkill, I. H. (1966). *A Dictionary of Economic Products of the Malayan Peninsula*. Vol. 2. The Ministry of Agriculture & Co-operatives, Kuala Lumpur, 1415-1416.

Cui, B., Chai, H., Dong, Y., Horgen, F. D., Hansen, B., Madulid, D. A., Soejarto, D. D., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzutto, J. M. and Kinghorn, D. A. (1999). Quinoline Alkaloids from *Acronychia laurifolia*. *Phytochem.* **52**, 95-98.

De Silva, L. B., De Silva, U. L. L., Mahendaran, M. & Jennings, R. (1979). Kokusaginine & Evolitrine from *Acronychia pedunculata*. *Phytochem.* **18**, 1255-1256.

De Silva, L. B., Herath, W. M., Liyanage, C., Kumar, V., Ahmad, V. U. & Sultana, A. (1991). Demethylacrovestone from *Acronychia pedunculata* fruits. *Phytochem.* **30**(5), 1709-1710.

Hartley, T. G. (1981). A Revision of the Genus *Tetradium* (Rutaceae). *Garden. Bull. Singapore.* **34**, 91-131.

Kumar, V., Karunaratne, V. & Meegalle, M. R. S. K. (1989). 1-[2', 4'-Dihydroxy-3', 5'-di-(3''-methylbut-2''-enyl)-6'-methoxy]phenyletanone from *Acronychia pedunculata* Root Bark. *Phytochem.* **28**(4), 1278-1279.

Muyard, F., Bissoue, A. N., Bevalot, F., Tillequin, F., Cabalion, P. & Vaquette, J. (1996). Acetophenones and Other Constituents from the Roots of *Melicope erromangensis*. *Phytochem.* **42**(4), 1175-1179.

Quader, A., Armstrong, J. A., Gray, A. I., Hartley, T. G. & Waterman, P. G. (1991). Chemosystematics of *Acradenia* and General Significance of Acetophenones in the Rutaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**(2), 171-176.

Rahmani, M., Taufiq-Yap, Y. H. & Sukari, M. A. (1996). Constituents of *Acronychia laurifolia*. *Fitoterapia.* **67**(2), 180-182.

Ridley, H. N. (1967). *The Flora of the Malay Peninsular*. Vol. 11. Reeve & Co., London.

Sy, L. K. & Brown, G. D. (1999). 1-[2', 4'-Dihydroxy-3'-(3''-methylbut-2''-enyl)-5'-(1''-ethoxy-3''-methylbutyl)-6'-methoxy]phenyletanone from *Acronychia pedunculata* *Phytochem.* **52** : 681-683.

Biopolimer Berliang Sebagai Penjerap Logam Berharga

Jamaluddin Mohd. Daud dan Wan Nor Azami Wan Omar

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan.
e-mail: jamal@pkrisc.cc.ukm.my, wnawo@hotmail.com

Abstrak

Satu jenis terbitan kitosan, iaitu resin melamin-kitosan-formaldehid (MKF) telah berjaya disintesis. Kemampuan MKF melakukan penjerapan atau prapemekatan bagi kuantiti surihan ion-ion logam Au(III), Pt(II) and Pd(II) telah diuji menggunakan kaedah statik. Mod pengadukan dan amaun MKF dibiarkan malar iaitu masing-masing 150 rpm and 0.1 g. Penentuan kuantitatif bagi ion-ion logam tersebut dilakukan dengan kaedah Spektrometri Pancaran Optik-Plasma Gandingan Aruhan (ICP-OES). Telah didapati bahawa kapasiti penjerapan bagi resin MKF adalah maksimum pada pH 1 dan masa penjerapan optimum adalah kurang daripada 15 minit bagi ketiga-tiga ion logam tersebut. Nyahjerapan bagi ion-ion logam tersebut daripada MKF telah dijalankan menggunakan beberapa agen pengelusi. Keputusan mendapati bahawa agen pengelusi terbaik ialah EDTA 0.1 M yang mana 100% nyahjerapan Au(III) diperolehi, diikuti oleh 89% bagi Pt(II) dan 86% bagi Pd(II).

Kata kunci: Prapemekatan; nyahjerapan; terbitan kitosan; ion logam Au(III), Pt(II) dan Pd(II).

1. Pendahuluan

Penjerap fasa pepejal yang berasaskan kitosan (hasil daripada N-deasetilasi kitin) boleh membentuk kompleks dengan kebanyakan ion logam terutamanya ion logam peralihan (Muzzarelli 1977, Kurita et al. 1979). Prapemekatan ion-ion logam peralihan yang berkepekatan rendah dalam julat ppm ke ppb boleh dilakukan dengan menggunakan kitosan (Milor et al. 1998). Kitosan adalah penjerap yang murah, mesra alam, boleh terbiodegradasi dan menunjukkan keselektifan dalam menjerap ion-ion logam peralihan pada kepekatan rendah (Rorrer et al.). Walau bagaimanapun kitosan tanpa taut-silang boleh melarut dengan mudah dalam medium berasid dan ini menjejaskan pemekatan logam. Ketahanan kitosan dalam medium berasid dan kapasiti penjerapannya boleh ditingkatkan dengan memasukkan kumpulan berfungsi yang sesuai secara modifikasi kimia (Inoue & Baba 1997). Kitosan bergabung dengan ion logam melalui interaksi penukaran ion, penjerapan dan pengkelatan

(Muzzarelli 1977) dan nyahjerapan ion logam dengan menggunakan agen pengkompleks (Inoue & Baba 1997). Kajian ini dijalankan untuk mengetahui kemampuan penjerapan tiga jenis ion logam berharga iaitu platinum, aurum dan paladium oleh satu jenis terbitan kitosan iaitu melamin-kitosan-formaldehid sebagai penjerap fasa pepejal.

2. Percobaan

Bahan dan Reagen

Semua bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah daripada gred 'Analara' atau bahan yang berketulenan tinggi. Formaldehid 35%, ammonia, asid hidroklorik pekat, asid nitrik dan asid asetik glasial diperolehi daripada Merck. Natrium hidroksida, natrium borohidrat, melamin, natrium sulfida, natrium sulfit, natrium tiosianat, ammonium tiosianat, EDTA, natrium hydrogen phosphate dan kalium tiosianat daripada Aldrich Chemical Co. Asid asetik dan larutan ammonia digunakan untuk menyediakan larutan buffer ammonium asetat. Serbuk kitosan tulen (nyahasetilan 86%)

dibekalkan oleh Chito-Chem (M) Sdn. Bhd. Garam piawai bagi platinum, aurum dan paladium diperolehi daripada Sigma. Air suling nyahion disediakan melalui sistem penulenan Barnstead E-Pure.

Instrumen

Penentuan logam dilakukan dengan menggunakan Spektrometer Pancaran Optik-Plasma Gandingan Aruhan (ICP-OES) Optima 4300V Perkin Elmer pada panjang gelombang optimum iaitu Pt 265.945 nm, Au 267.595 nm dan Pd 340.458 nm. Selain itu meter pH (Mettler Delta 320), penimbang (Electronic Balance ER-120A) dan Spektrometer Inframerah Transformasi Fourier (FTIR) jenis Perkin Elmer, Model Gx juga digunakan.

Penyediaan Melamin-kitosan-formaldehid (MKF)

Isipadu 50 ml larutan asid asetik 2% b/i dimasukkan ke dalam kelalang refluk 500 ml. Sebanyak 5g serbuk kitosan ditambah ke dalam kelalang sambil dikacau sehingga kitosan melarut. Isipadu 50 ml larutan formaldehid 35% b/i ditambah, diikuti dengan 31.5 g melamin sambil dikacau dengan pengacau mangnet. Campuran direfluk selama 15-20 minit sambil dikacau. Selepas tempoh ini, larutan jernih bertukar kepada gel lutsinar. Sebaik sahaja gel terhasil, larutan natrium hidroksida 10% ditambahkan perlahan-lahan. Gel bertukar kepada pepejal putih pada pH 10 dan tidak larut dalam air. Resin melamin-kitosan-formaldehid yang terhasil dibilas dengan 1 M HCl, air nyahion panas dan dikeringkan. Bagi kegunaan khusus, resin dibilas secara berlebihan dengan 1 M HCl, 1M HNO₃, 0.1 M natrium hidroksida dan air nyahion yang mencukupi. Kemudian dikeringkan, ditimbang, dikisar dan diayak ke saiz 75-45 µm. Resin MKF dilakukan pencirian menggunakan FTIR.

Kaedah Prapemekatan Ion Logam

Sebanyak 0.1 g serbuk MKF bersaiz 75-45 µm dimasukkan ke dalam bikar 100 ml setiap satunya. Larutan 50 ml ion logam Pt(II), Au(III) dan Pd(II) berkepekatan 2.0 hingga 100.0 mg/L masing-masing dimasukkan ke dalam setiap bikar sambil diaduk dengan kelajuan 150 rpm. Masa penambahan larutan logam dicatatkan. Sebanyak 1 ml larutan tersebut dipipetkan ke dalam tabung uji pada sela masa tertentu ke dalam tabung uji berlabel

dan dianalisis secara kuantitatif menggunakan instrumen ICP-OES. Prapemekatan oleh MKF pada pH 1, 3, 5, 7, 9 dan 11 dilakukan untuk mendapatkan pH yang optimum bagi penjerapan ketiga-tiga ion logam tersebut. Nyahjerapan terhadap ion-ion logam yang terjerap pada MKF dilakukan menggunakan 10 ml larutan KSCN 1M, NaSCN 1M, NH₄SCN 1M, Na₂HPO₄ 0.1M, EDTA 0.1M dan Na₂SO₃ 0.1M untuk menentukan agen pengelusi terbaik.

3. Hasil dan Pembahasan

Spektrum FTIR bagi MKF

Spektrum inframerah bagi kitosan tulen (Rajah 1) dibandingkan dengan spektrum MKF (Rajah 2) yang telah diperolehi daripada instrumen FTIR. Jenis getaran pada nombor gelombang bagi masing-masing puncak yang signifikan pada spektrum tersebut disenarai dalam Jadual 1. Regangan N-H dan O-H menunjukkan struktur kitosan pada sampel MKF masih wujud. Kemunculan regangan C=N, C-N dan C-H menunjukkan terbentuknya ikatan antara melamin, formaldehid dan kitosan dalam MKF.

Keadaan Optimum Prapemekatan

Masa Penjerapan

Masa penjerapan yang optimum bagi MKF terhadap ion-ion logam Pt(II), Au(III) dan Pd(II) didapati tercapai dalam masa kurang daripada 15 minit seperti ditunjukkan dalam Rajah 3. Kitosan dan terbitanya dapat dikatakan sebagai suatu bahan mikroporous (Muzzarelli 1977). Penjerapan ion logam daripada larutan oleh kitosan dan terbitan kitosan melibatkan 3 langkah berturutan iaitu pengangkutan ion logam kepada permukaan luaran penjerap, penyebaran ion logam ke dalam liang penjerap dan penjerapan ion logam pada permukaan dalaman penjerap yang merupakan langkah penentu kadar penjerapan (Kurita et al. 1979). Secara relatif, kapasiti penjerapan oleh MKF terhadap ion-ion Pt(II) adalah lebih tinggi berbanding dengan Au(III) dan diikuti oleh Pd(II).

pH Optimum

Keputusan ujikajian penjerapan dalam julat pH 1 ke 11 ditunjukkan dalam Rajah 4. Didapati bahawa pH optimum bagi penjerapan ketiga-tiga ion logam Pt(II), Au(III) dan Pd(II) oleh MKF adalah pada pH 1. Ini bersesuaian dengan apa yang telah dilaporkan iaitu terbitan kitosan lebih tahan berbanding kitosan tulen pada keadaan asid disebabkan taut silang yang boleh

mengurangkan keterlarutannya dalam larutan akuas pada pH rendah (Tan et al. 1999). Ini juga menunjukkan MKF seperti juga terbitan kitosan lain adalah stabil dalam keadaan berasid dan berfungsi secara efektif sebagai resin penukar ion untuk ion logam iaitu pada pH kurang daripada 7 (Gao et al. 2000).

Agen Pengelusi

Dalam kajian ini, penggunaan 6 jenis larutan akuas iaitu Na_2SO_3 , NaSCN , NH_4SCN , EDTA, Na_2HPO_4 dan KSCN sebagai agen pengelusi adalah untuk mengelakkan penggunaan pelarut organik yang akan menimbulkan masalah apabila dianalisis dengan instrumen ICP-OES. Peratus nyahjerapan terhadap jenis pengelusi ditunjukkan dalam Rajah 5. Larutan EDTA 0.1 M telah didapati sebagai pengelusi terbaik dengan memperoleh peratus nyahjerapan sehingga 100% bagi Au(III), 89% bagi Pt(II) dan 86% bagi Pd(II).

Sisihan piawai relatif sebanyak 1.8, 3.6 dan 3.2% bagi 10 penentuan masing-masing ion-ion Au(III), Pt(II) dan Pd(II) pada kepekatan 10 mg/L dan isipadu 50 ml telah diperolehi daripada penggunaan MKF untuk prapemekatan.

4. Kesimpulan

Daripada ujikajian ini telah mendapati bahawa MKF berupaya menjerap ion-ion Au(III), Pt(II) dan Pd(II) dalam masa yang agak pantas iaitu kurang daripada 15 minit pada pH 1 dan agen pengelusi terbaik ialah larutan akuas EDTA 0.1M.

5. Ucapan Terima Kasih

Penghargaan dituju kepada Universiti Kebangsaan Malaysia atas segala kemudahan yang disediakan dan Kerajaan Malaysia atas bantuan kewangan IRPA yang bernombor 09-02-02-0046 EA 142.

6. Daftar Pustaka

Gao, Y., Lee, K. H., Oshima, M. & Motomizu, S. 2000. Adsorption behaviour of metal ions on cross-linked chitosan and the determination of oxoanions after pretreatment with a chitosan column. *Anal. Sci.*, 16: 1302-1307.

Inoue, K. & Baba, Y., 1997. Adsorption and separation behavior of chitosan and chemically modified chitosan for metal ions. 1. *Nippon Ion Kokan Gakkai.*, 8(2):115-121.

Kurita, K., Sunnan, T. & Iwakura, Y., 1979. Studies on chitin. VI. Binding of metal cations. *J. Appl. Polymer Sci.*, 23: 511-515.

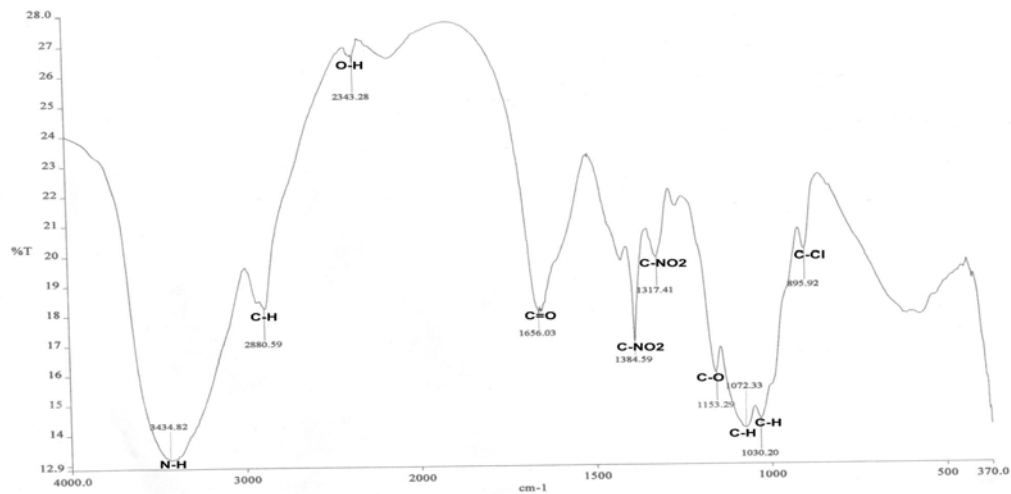
Milot, C., Tobin, J.M. dan Guibal, E., 1998. Metal-anion sorption by chitosan beads: equilibrium and kinetics studies. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37(4): 1454-1463.

Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin*. Pergamon Press Ltd., Oxford, England.

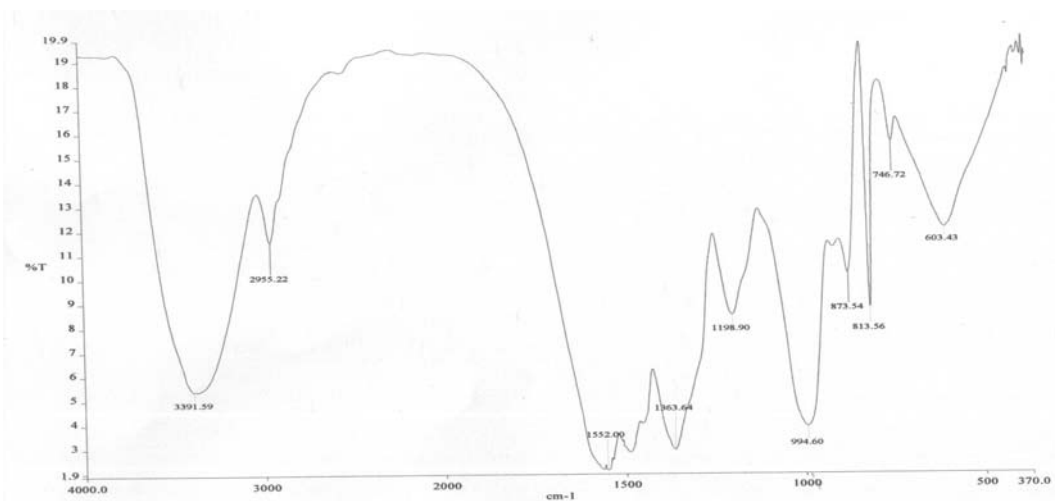
Rorrer, G.L., Tzu-Yang Hsien & Way, J.D. 1993. Synthesis of porous magnetic chitosan bead for removal of cadmium ions from wastewater. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 32: 2170-2177.

Tan, S., Wang, Y., Peng, C. & Tang, Y. 1999. Synthesis and adsorption properties for metal ions of crosslinked chitosan acetate crown ethers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 71(12):2069-2074.

LAMPIRAN



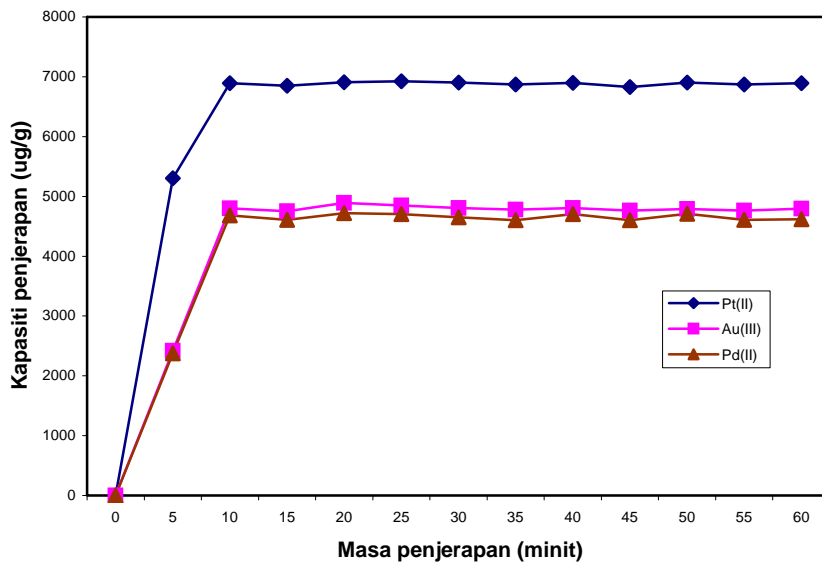
Rajah 1: Spektrum FTIR bagi kitosan tulen



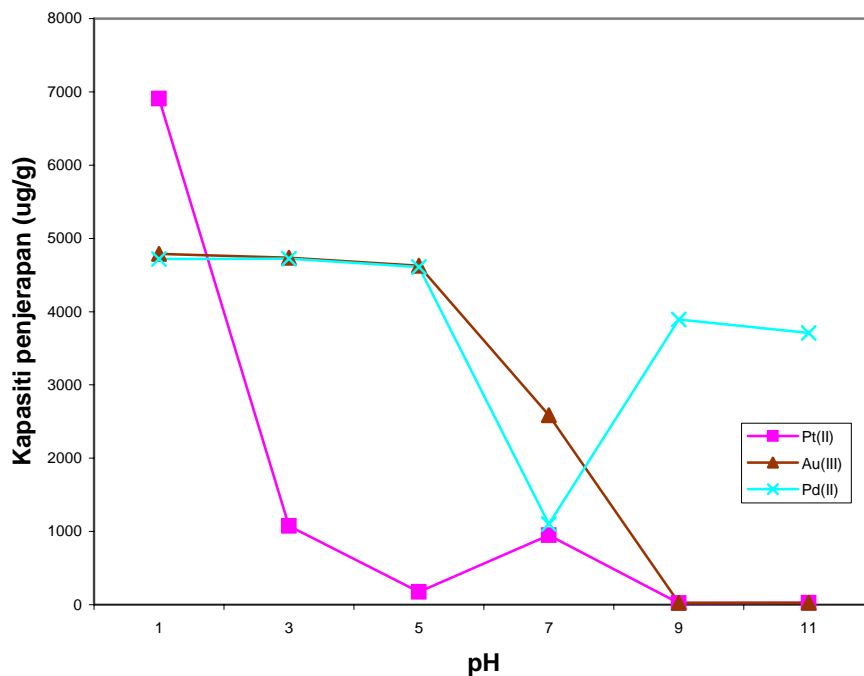
Rajah 2: Spektrum FTIR bagi MKF

Jadual 1: Data FTIR bagi MKF

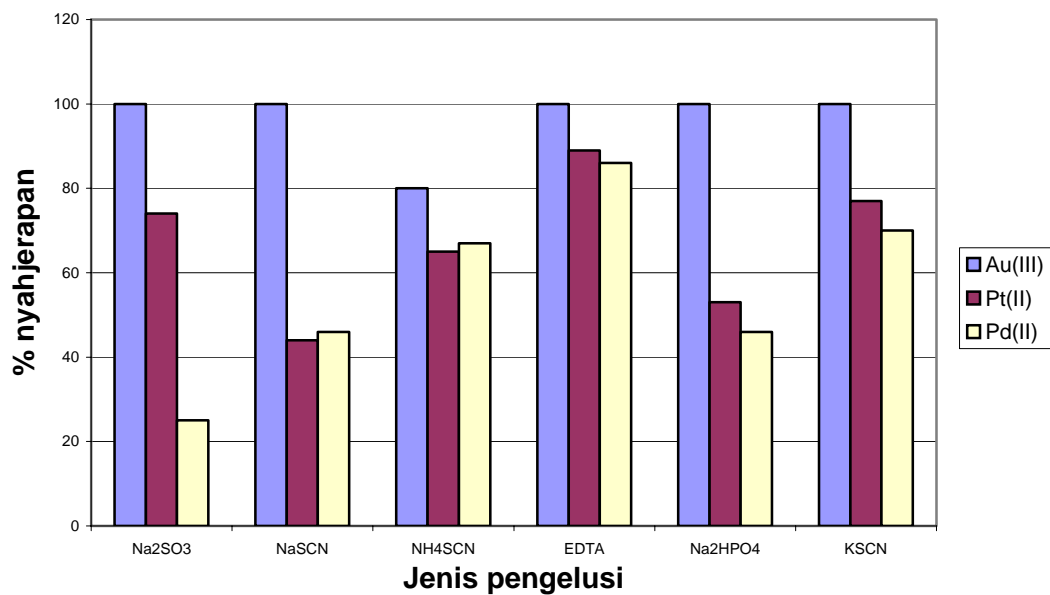
Nombor Gelombang (cm ⁻¹)	Jenis Getaran
3391	Regangan N-H bagi amina
2955	Regangan C-H
1552	Regangan C=N bagi amida
1363	Regangan C-N



Rajah 3: Kapasiti penjerapan melawan masa bagi penjerapan ion logam Pt(II), Au(III) dan Pd(II)



Rajah 4: Kapasiti penjerapan ion logam Pt(II), Au(III) dan Pd(II) melawan pH larutan



Rajah 5: Histrogram menunjukkan % nyahjerapan melawan jenis pengelusi

Electric Field Enhancement Effect dalam TiO₂ Fotoelektrokatalisis: Prinsip Kerja, Konsekuensi Desain Reaktor, dan Usulan Novel Photoelectrocatalytic Reactor

Jarnuzi Gunlazuardi¹⁾, Hedi Surahman²⁾, Slamet³⁾

1) Departemen Kimia, Universitas Indonesia
Depok, 16424, Indonesia
e-mail: Jarnuzi@ui.edu

2) Departemen Kimia, Universitas Indonesia
Depok, 16424, Indonesia

3) Departemen Teknis Gas dan Petrokimia, Universitas Indonesia
Depok, 16424, Indonesia

Abstrak

Iluminasi TiO₂ dengan sinar ultra violet ($\lambda < 410$ nm) menghasilkan pasangan elektron (pada pita konduksi) dan positive hole, h^+ , (pada pita valensi). Telah diamati bahwa, iluminasi film TiO₂ dengan sinar ultra violet yang disertai dengan pemberian tegangan listrik positif (anodik) meningkatkan photocurrent secara signifikan. Difahami bahwa atas pengaruh medan listrik tersebut timbul lapisan deplesi pada pita valensi dan pita konduksi, dimana ujung kedua lapisan pita energi tersebut dipermukaan film TiO₂ lebih besar dibandingkan dengan didalam bulk. Keadaan tersebut mengakibatkan hole (h^+) yang terbentuk pada pita valensi mempunyai kecenderungan besar bergerak ke permukaan film, sementara elektron pada pita konduksi justru mempunyai kecenderungan tergelincir ke bagian bulk dan melalui back contact diteruskan ke counter electrode (katodik). Meningkatnya photocurrent merupakan representasi meningkatnya kerapatan arus elektron yang melewati sirkuit luar dan dilepaskan ke larutan melalui katoda, yang hakikatnya sebanding dengan ketersediaan h^+ pada permukaan film TiO₂ (anodik). Hole positif (h^+) tersebut akan menginisiasi reaksi oksidasi dan didalam lingkungan aqueous akan menghasilkan radikal hidroksil ($\bullet OH$). Radikal hidroksil mempunyai potensial oksidasi $\sim 2,8$ V vs NHE yang hakikatnya dapat mengoksidasi hampir kebanyakan senyawa organik beracun menjadi senyawa yang lebih sederhana. Sebagai tambahan radikal hidroksil dipercaya dapat melakukan penetrasi kedalam sel mikroba dan merusak sistem hidupnya. Dapat dikatakan bahwa pemberian medan listrik pada film TiO₂ (anodik) memberikan efek peningkatan kemampuan film TiO₂ dalam menghasilkan radikal hidroksil. Namun realisasi keadaan tersebut menjadi sistem reaktor fotoelektrokatalisis memerlukan persyaratan desain khusus, mengingat ekpose sinar dan medan listrik pada permukaan film TiO₂ harus dilakukan pada saat bersamaan dan kontinyu. Akan didiskusikan desain umum reaktor fotoelektrokatalisis dan usulan desain novel reaktor fotoelektrokatalisis. Desain baru yang diusulkan memanfaatkan keuntungan desain reaktor menggunakan kolom gelas yang bagian dalamnya dilapisi film TiO₂ (Inner Wall Glass Column Tube Coated with TiO₂ Film, IWGCT-TiO₂) dan penyinaran dari arah luar kolom yang baru-baru ini kami kembangkan.

Paper is not available

Fabrikasi Elektroda Karbon Pasta Yang Dimodifikasi (EKPM) dengan Kaliks(6)aren: Perilaku Siklik Voltametri dan Aplikasinya Untuk Penentuan Ion Hg^{++}

Jarnuzi Gunlazuardi¹⁾, Rahmat Wibowo¹⁾, Zaenal Awaludin¹⁾; Ros Kusuma Dewi¹⁾, dan Cuk Imawan²⁾

1) Departemen Kimia, FMIPA-UI,
Depok 16424, Indonesia
Jarnuzi @ui.edu

2) Departemen Fisika, FMIPA-UI
Depok 16424, Indonesia

Abstrak

Telah dikembangkan elektroda karbon pasta yang dimodifikasi (EKPM) dengan kaliks(6)aren dan dipelajari perilaku siklik voltameternya. EKPM disiapkan dengan mencampurkan larutan kaliks(6)aren kedalam bubuk grafit, dimana setelah pelarut organiknya diuapkan molekul kaliks(6)aren akan melapisi permukaan grafit. Grafit yang telah terlapisi kemudian ditambah campuran resin, peneras, dan/atau aditif lainnya dengan perbandingan yang sesuai sampai terbentuk pasta dan dikemas kedalam tabung gelas ($l=60$ mm; $id=2,2$ mm). Kontak ohmic EKPM dilakukan dengan kawat tembaga. Perlakuan panas dan ageing terhadap EKPM memungkinkan terjadinya interaksi kimiawi antara grafit dengan modifier yang memfasilitasi komunikasi elektrokimia antara EKPM dengan ion logam didalam permukaan elektroda. Keberhasilan sensing elektrokimia ditunjukkan oleh kemunculan arus anodik yang khas pada pola siklik voltamogram EKPM didalam larutan yang mengandung ion merkuri (II) dan elektrolit pendukung, dimana pola yang sama tidak muncul pada elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi. Lebih jauh besarnya arus anodik tersebut meningkat sejalan bertambahnya konsentrasi ion merkuri (II), dengan tingkat kelinieran yang baik pada daerah antara 10^{-6} M \sim 10^{-5} M ($R=0,9894$), dan presisi yang cukup baik ($RSD=2,51$ %). Pengukuran dilakukan dengan kondisi scan potensial dari $-0,6$ volt s/d $+0,6$ volt (vs Ag/AgCl), waktu akumulasi 3 menit, scan rate 100 mV/s, pH 5 dan elektrolit 0,1M KI.

Kata kunci: elektroda karbon pasta, kaliks(6)aren, ion merkuri, voltamogram siklik, arus anodik.

1.a. Pendahuluan

Majunya perkembangan metoda dan teknik modifikasi kimiawi permukaan elektroda (*Chemically Modified Electrode, CME*) memberi keleluasaan dan *opportunity* yang hampir tak terhingga terhadap pengembangan sensor elektrokimia yang selektif dan sensitif. Berbagai bahan elektroda dapat dimodifikasi permukaannya dengan senyawa kimia yang akan memberikan dampak kepada kespesifikan dan kesensitifannya (Khoo *et al*, 1999). Diantara berbagai bahan elektroda, yang dapat dimodifikasi secara kimiawi, grafit (salah satu alotrof karbon) meraih kepopuleran tersendiri

terlebih dengan dikenalnya grafit dalam bentuk pasta atau yang lebih dikenal sebagai elektroda karbon pasta.

Campuran karbon dengan parafin atau karbon dengan resin (dan bahan peneras) dengan komposisi tertentu menghasilkan karbon pasta yang dapat dikemas kedalam tabung gelas atau bahan lainnya. Lebih jauh karbon pasta, khususnya adonan grafit dengan resin dan bahan peneras (*hardener*) dapat dilekatkan atau dicetak (*screen printed*) pada berbagai bahan penunjang. Sebelum atau pada saat pengolahan menjadi pasta, kepada permukaan

grafit dapat kita lekatkan sebagai lapisan tipis suatu bahan kimia fungsional yang memodifikasi permukaan grafit dan memberi dampak kepada perilaku kimia baru yang berbeda dari permukaan grafit yang tidak dimodifikasi. Elektroda karbon (grafit) yang telah dimodifikasi memberikan perilaku elektrokimia yang khas, bergantung kepada kekhasan interaksi antara bahan kimia *modifier* permukaan grafit dan analit disekitar permukaan elektroda. Elektroda seperti itu dikenal sebagai elektroda karbon pasta yang dimodifikasi secara kimiawi (*Chemically Modified Carbon Paste Electrode, CMCPE*).

Berbagai senyawa kimia telah digunakan sebagai *modifier* pada *CMCPE*. Beberapa contoh yang dapat disebutkan diantaranya adalah: elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan dimetilglioksim telah digunakan untuk penentuan Ni^{2+} (Baldwind *et al*, 1986); 2-metil-8-hidroksiquinolin (Khoo *et al*, 1999) dan 3,4-dihidro-4,4,6-trimetil-2-pirimidintion (Abbaspour & Moosavi, 2002) digunakan untuk penentuan Cu^{2+} , dan masih banyak contoh lagi. Diantara banyak senyawa yang dapat digunakan sebagai *modifier*, kami tertarik untuk mengeksplorasi kelompok senyawa yang dikenal sebagai kaliksaren. Kaliksaren merupakan suatu senyawa makromolekul yang termasuk dalam kelas siklooligomer.

Struktur kaliksaren terdiri dari tiga bagian, yaitu *upper rim*, *central anulus*, dan *lower rim*. Bagian *upper rim* terdiri dari cabang alkana yang akan dilekatkan kepada grafit, sedangkan bagian *lower rim* berupa gugus polar yang akan menghadap ke larutan *aqueous* dimana analit berada. Telah banyak dilaporkan bahwa kelompok senyawa kaliksaren dapat berfungsi sebagai ligan pengektrek ion-ion logam didalam air, dimana interaksi ion logam dengan kaliksaren terjadi karena kesesuaian rongga *lower rim* dan/atau melalui ikatan kovalen kordinasi. Manakala ion logam yang sesuai sudah terikat atau berada didalam daerah *lower rim*, yang *nota bene* terikat pada elektroda grafit, dan kepada elektroda grafit diberi bias potensial yang sesuai (voltametri siklik) maka akan terjadi proses redoks terhadap ion logam terkait. Sebagai hasilnya akan diperoleh *voltamogram* siklik yang khas sesuai dengan ion logam terkait. Paper ini melaporkan

fabrikasi elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren, investigasi perilaku siklik voltametri dan aplikasinya untuk sensing terhadap ion merkuri. Sedangkan diskusi dan analisis lebih mendalam akan dipublikasikan ditempat lain (Gunlazuardi *et al*, 2005)

1.b. Pendekatan Konseptual

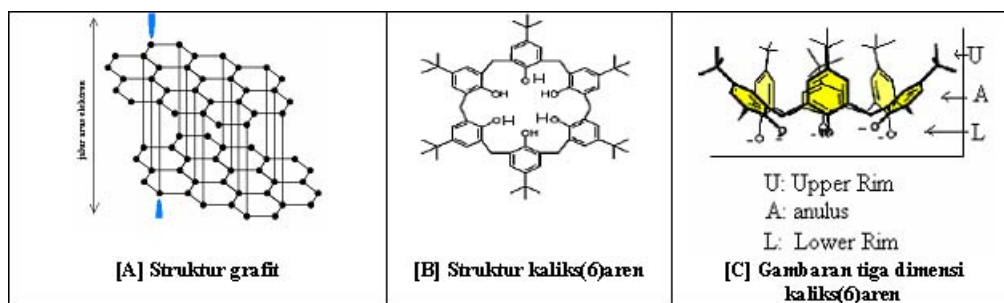
Grafit adalah salah satu bentuk alotrof karbon, dimana atom karbon membentuk susunan heksagonal dengan lembaran segi enam. Masing-masing atom karbon memiliki tiga tetangga atom karbon terdekat dan membentuk segitiga sama sisi (Hurlbut & Cornelius, 1971). Tiga dari empat elektron valensi pada setiap atom karbon membentuk tiga ikatan kovalen dengan tiga atom karbon lainnya. Sementara elektron valensi ke empat tetap bebas, yang pada saatnya dapat bebas bergerak, menjadikan grafit mampu menghantar arus listrik (gambar 1). Elektron valensi keempat pada ujung tertentu juga dapat sebagai site aktif untuk terjadinya ikatan kimia dengan senyawa kimia *modifier*. Apabila *modifier* dapat mengakomodasikan pengembangan delokalisasi elektron melalui ikatan rangkap terkonjugasi, maka gangguan elektron pada salah satu ujung bagian *modifier* akan diteruskan ke bagian ujung lain dari *modifier* yang berikatan dengan grafit. Dinamika elektron pada grafit kemudian diteruskan ke sirkuit eksternal dan counter elektroda, sehingga pasangan elektroda kerja (grafit yang telah dimodifikasi) dan counter elektroda (misalnya, platina) akan memberikan respon yang spesifik terhadap reaksi redok analit pada permukaan elektroda kerja.

2. Bahan dan Metoda

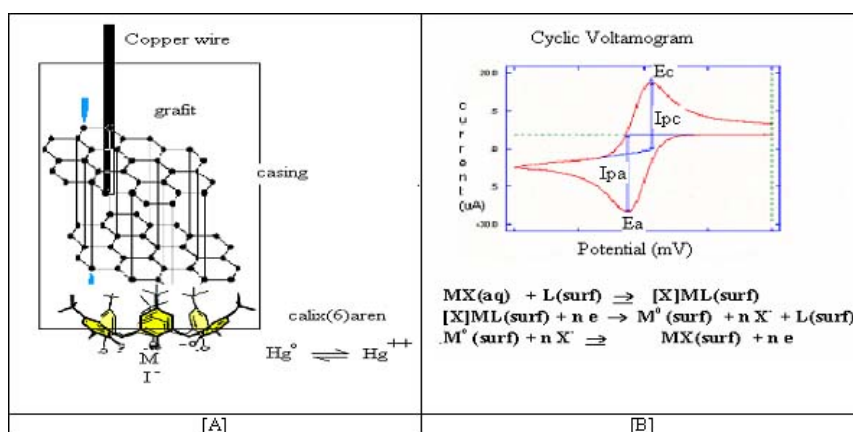
Bahan.

Bahan Kimia. Bubuk grafit (Merck), merkuri (II) nitrat monohidrat (*p.a*), alumunium (III) klorida heksahidrat (*p.a*), kalsium (II) nitrat dihidrat (*p.a*), tembaga (II) nitrat tetrahidrat (*p.a*), seng (II) klorida dihidrat (*p.a*), magnesium (II) nitrat dihidrat (*p.a*), kloroform, metanol, buffer asetat 0,1M, epoksi resin (Dextone), kaliks(6)aren (Sigma), *Aquademineralisata*.

Bahan pengemas elektroda. Kawat tembaga (diameter = 1,5 mm), *glass tube*, kertas silicon karbida No.1500 untuk *polishing*.



Gambar 1. Gambaran struktur grafit [A] [B] dan struktur kaliks(6)aren, serta gambaran bagaimana kaliks(6)aren mengatur diri sehingga membentuk ruang tiga dimensi unik [C] yang dapat berfungsi sebagai pasangan "host-guest" terhadap ion logam yang mendekati pada lower rim di fasa air.



Gambar 2. Gambaran konseptual konstruksi elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren didalam casing tabung gelas dan kawat tembaga sebagai kontak ohmik [A] dan gambaran voltamogram siklik yang dihasilkan pada saat elektroda disusun pada sel voltametri

Metoda.

Fabrikasi elektroda. Sejumlah tertentu kaliks(6)aren (e.g. 0,01 g) dilarutkan kedalam 10 ml pelarut kloroform:metanol (2:1). Kemudian kedalam larutan tersebut dimasukkan sejumlah tertentu (0,2 g) bubuk grafit dan diaduk hingga homogen dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 12 jam hingga pelarutnya menguap. Sejumlah bubuk grafit yang sudah dimodifikasi (0,1 ~ 0,30 gram) dan bahan perekat (resin & pengeras, 1:1) dimasukan dalam cawan porselin dan diaduk hingga homogen. Adonan kemudian dimasukkan kedalam *glass tube* yang telah dipotong (l = 6 cm; id=0,22 cm) ditekan pada bagian lubang hingga campuran bubuk grafit masuk kedalam *glass tube* setinggi 2 cm. Kawat tembaga sepanjang 6,5 cm dimasukan ke dalam *glass tube* pada bagian lubang atas lalu ditekan sekuat-kuatnya hingga jarak permukaan bagian bawah elektroda dengan ujung tembaga berjarak 2 mm. Elektroda ini dipanaskan dalam oven pada suhu 60°C selama 48 jam, lalu disimpan didalam desikator.

Sebelum digunakan bagian permukaan elektroda digosok dengan kertas silikon karbida No. 1500 hingga halus, dan diukur diukur hambatannya dengan Digital Multimeter.

Pengukuran elektrokimia. Sebanyak 5 ml larutan $1 \times 10^{-3} \text{M}$ Hg^{2+} dimasukkan kedalam labu 50 ml. Kedalamnya dimasukkan sejumlah tertentu larutan KI (0,830 g) dalam buffer asetat 0,1M dan kemudian volumenya dijadikan tepat 50 ml dengan bantuan buffer asetat, sehingga menghasilkan larutan $1 \times 10^{-4} \text{M}$ Hg^{2+} ; 0,1M KI dan pH nya sama dengan 5,00 ($\pm 0,1$). Larutan ini dituangkan ke dalam sel elektrokimia yang disusun seperti pada Gambar 3.2 lalu dihubungkan dengan potensiostat, yaitu VersaStat II (Princeton Applied Research, USA). Potensial awal dipilih mulai dari .0.9V dan potensial akhir 0,4V, *scanrate* 100 mV/s, waktu akumulasi 3 menit dan aliran gas nitrogen. Tinggi puncak arus dihitung dari perpanjangan *base line* ingá puncak arus maksimum dari *cyclic voltammogram*. Jumlah kaliks(6)aren dalam elektroda optimum dipilih

berdasarkan tinggi puncak arus pada *cyclic voltammogram*.

3. Hasil dan Pembahasan

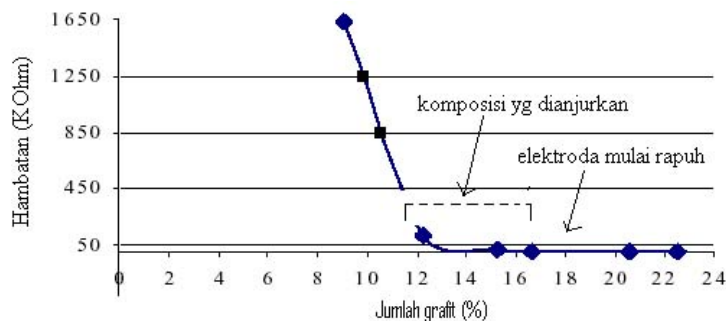
Pembuatan elektroda karbon pasta

Pengaruh Komposisi Karbon. Studi pengaruh komposisi karbon dalam pembuatan elektroda karbon pasta dilakukan dengan memvariasikan jumlah karbon dan jumlah epoksi yang sama, yaitu 0,5 gr dan perbandingan resin dengan pengeras sama (1:1). Elektroda karbon pasta yang digunakan adalah yang memiliki hambatan listrik kecil dan tidak mudah rapuh. Hasil pengukuran hambatan listrik dari berbagai elektroda yang disiapkan ditunjukkan pada Gambar 3. Pengamatan menunjukkan bahwa elektroda dengan komposisi grafit antara 10 % sampai 17 % memberikan hambatan kecil yang kondusif untuk digunakan sebagai sensor dan mempunyai sifat fisik yang sebagai pasta yang baik, tidak rapuh setelah kering dan tidak terkikis selama pemakaian. Komposisi grafit diatas nilai tersebut memberikan hantaran yang baik, namun elektrodanya menjadi sangat rapuh.

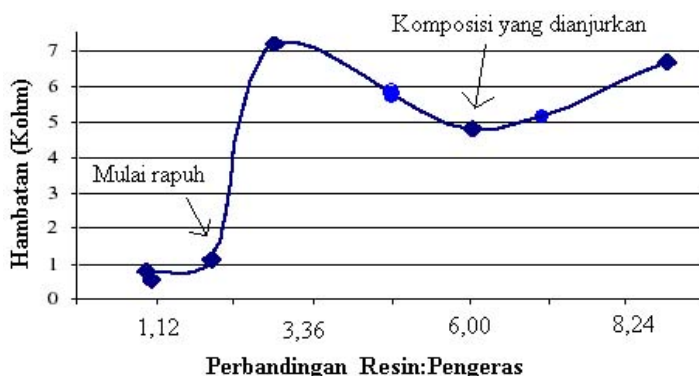
Pengaruh komposisi/perbandingan Resin dan Pengeras. Pengaruh komposisi resin (R) dan pengeras (P) terhadap sifat elektroda karbon

pasta dipelajari dengan memvariasikan perbandingan resin dan pengeras dengan jumlah karbon yang sama, yaitu 0,2 gr. Diamati bahwa makin sedikit jumlah pengeras maka hambatannya makin besar. Pada perbandingan R:P = 3/2, 6/1, dan 9/1 elektroda memiliki hambatan yang lebih besar. Namun jika komposisi pengerasnya ditambah sifat elektroda karbon pasta ternyata mudah mengalami pengikisan, bahkan dengan kertas biasa. Berdasarkan hasil ini maka dipilih perbandingan R:H=6:1, yang merupakan komposisi dengan sifat elektroda karbon pasta yang baik.

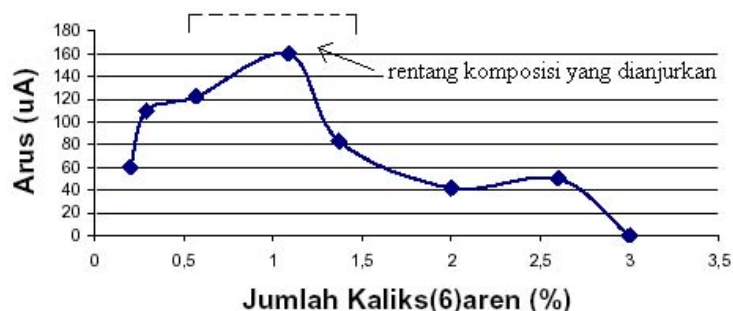
Pengaruh jumlah kaliks(6)aren dalam elektroda karbon pasta. Pengaruh komposisi kaliks(6)aren dalam elektroda karbon pasta dipelajari dengan mengevaluasi tinggi puncak arus yang dihasilkan pada *cyclic voltammogram* sebagai respon terhadap adanya 1×10^{-4} M Hg^{2+} . Dari hasil *cyclic voltammogram* ini ditentukan sensitivitas elektroda terhadap Hg^{2+} dengan mengukur tinggi puncak arusnya. Pengamatan menunjukkan bahwa pada jumlah kaliks(6)aren 0,20% hingga 1,09% puncak arus yang dihasilkan bertambah besar, ini karena jumlah



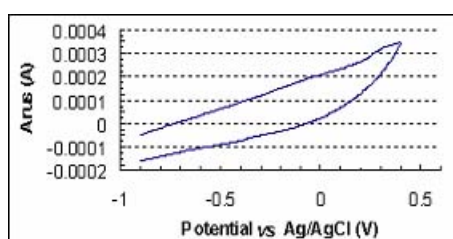
Gambar 3. Pengaruh komposisi grafit dalam adonan pasta pada hambatan elektroda.



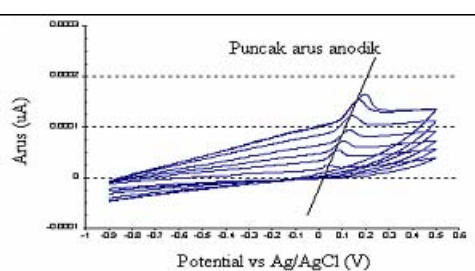
Gambar 4. Pengaruh komposisi/perbandingan Resin dan Pengeras grafit dalam adonan pasta pada hambatan elektroda.



Gambar 5. Pengaruh komposisi kaliks(6)aren dalam adonan pasta pada tinggi puncak voltamogram.



Gambar 6.A. Siklik voltametri elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi, diukur pada larutan yang mengandung ion Hg^{2+} 1×10^{-4} M, 0,1M KI, b ufer asetat pH 5.



Gambar 6.B. Siklik voltametri elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren, diukur pada larutan yang mengandung ion Hg^{2+} 1×10^{-4} M, 0,1M KI, b ufer asetat pada pH 5

kaliks(6)aren pada permukaan elektroda semakin banyak sehingga dapat mengikat Hg^{2+} lebih banyak. Namun pada jumlah kaliks(6)aren yang lebih besar dari 1,09% puncak arus cenderung menurun, ini disebabkan karena makin banyaknya modifier akan menghambat transfer elektron kedalam badan elektroda. Jumlah kaliks(6)aren sebanyak 1,09% menghasilkan respon yang maksimum untuk Hg^{2+} . Jumlah ini cukup kecil karena kaliks(6)aren merupakan senyawa makromolekul sehingga lebih mudah menghasilkan sisi aktif pada permukaan elektroda karbon pasta.

Perilaku siklik voltametri elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren dan dinamika tinggi arus anodik pada puncak voltamogram.

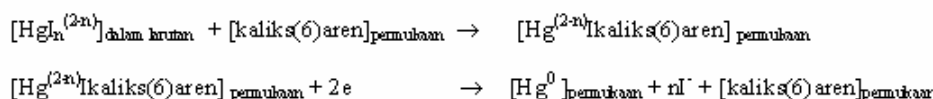
Perbandingan respon elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi dan yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren. Untuk mengetahui perbedaan respon elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi dan yang dimodifikasi dengan Kaliks(6)aren, kedua elektroda diuji responnya terhadap larutan 1×10^{-4} M Hg^{2+} sebagai target analit. Perbedaan respon yang dihasilkan dapat kita lihat pada Gambar 6 A dan 6B. Elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi tidak dapat merespon spesifik terhadap keberadaan Hg^{2+} dalam larutan

(Gb.6A), sementara pada elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren memberikan respon berupa arus anodik yang khas (Gb.6B).

Respon yang dihasilkan menunjukkan adanya puncak arus yang merupakan arus anoda. Arus anoda yang dihasilkan merupakan hasil re-oksidasi Hg^0 menjadi Hg^{2+} , tahapan reaksi yang mungkin terjadi pada permukaan elektroda ditunjukkan pada skema 1:

Dari Gambar 6 B terlihat adanya puncak arus yang kecil pada 0,5 V, ini disebabkan dari oksidasi Hg^0 menjadi Hg_2^{2+} (Kong *et al*, 2002) dimana potensial oksidasi Hg^0 menjadi Hg_2^{2+} adalah -0,792 V dan Hg^0 menjadi Hg^{2+} adalah 0,854 V (Anonim, 2003) sehingga dari nilai potensial ini dapat dijelaskan bahwa Hg_2^{2+} akan lebih awal terbentuk pada potensial yang lebih kecil. Elektrolit 0,1M KI yang berada dalam larutan sebagai medium pengakumulasi (Huang *et al* 2002). Elektrolit lain seperti KCl, KNO_3 dan HNO_3 tidak dapat menghasilkan puncak arus seperti pada Gambar 6B. Peranan utama dari larutan elektrolit ini adalah memfasilitasi proses akumulasi untuk membentuk kompleks ligan ganda, $Hg(kaliks(6)aren)(I)_n^{2-n}$. Dari sini dapat kita simpulkan bahwa I sangat berperan dalam pengikatan Hg^{2+} dengan kaliks(6)aren.

(1) Proses akumulasi :



(2) Proses pelepasan :



Skema 1. Tahapan reaksi yang mungkin terjadi pada permukaan elektroda

Dalam larutan 0,1M KI komponen utama yang terbentuk dengan Hg^{2+} adalah HgI_3^- , yang tersolvasi oleh satu molekul H_2O dengan bentuk tetrahedral (Kong *et al*, 2002). Dengan adanya gugus .OH pada kaliks(6)aren, spesi HgI_3^- kemungkinan akan berikatan dengan salah satu gugus .OH pada kaliks(6)aren sehingga membentuk kompleks ligan ganda dengan bentuk tetrahedral. Jadi dengan satu molekul kaliks(6)aren kemungkinan dapat mengikat enam ion Hg^{2+} yang menyebabkan jumlah kaliks(6)aren dibutuhkan dalam elektroda karbon pasta hanya sedikit (1,09%) dari pada umumnya, yaitu 10-30% (Anonim, 2003)

Pengaruh potensial awal. Pemilihan potensial awal pada voltametri siklik sangat penting untuk menghasilkan reaksi reduksi yang sempurna pada Hg^{2+} menjadi Hg^0 . Pengaruh potensial awal terhadap tinggi puncak arus dapat kita lihat pada Gambar 7, dimana terlihat bahwa pada potensial awal -0,4 V hingga pada potensial awal -0,8 V terjadi kenaikan tinggi puncak arus. Pada potensial awal -0,4 V tinggi puncak arus sebesar 110,9 μA dan -0,8 V sebesar 131,1 μA , ini disebabkan karena pada potensial -0,4 V Hg^{2+} tidak tereduksi sempurna bila dibandingkan pada saat -0,8 V (Huang *et al*, 2002). Sedangkan potensial awal yang lebih negatif dari -0,8 V, puncak arus menjadi berkurang akibat adanya intervensi reduksi H^+ menjadi H_2 (Khoo, *et al*, 1999). Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa arus maksimum terjadi pada potensial awal -0,8 V.

Pengaruh waktu akumulasi Pengaruh waktu akumulasi terhadap tinggi puncak arus dapat dilihat pada Gambar 8. Diamati bahwa waktu akumulasi yang bertambah menghasilkan kenaikan tinggi puncak arus. Waktu akumulasi 1 menit hingga 3 menit memperlihatkan kenaikan puncak arus yang besar, sedangkan

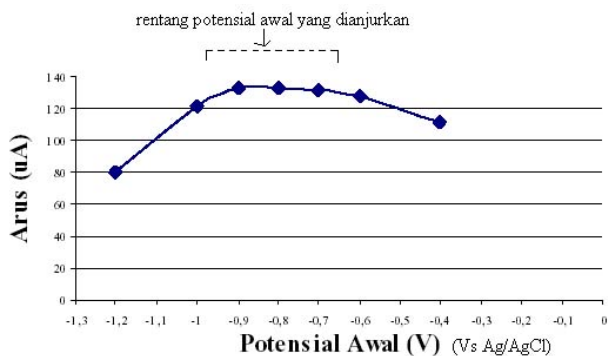
waktu akumulasi yang lebih lama dari 3 menit tidak lagi menunjukkan kenaikan arus yang signifikan. Lamanya waktu akumulasi akan memberi kesempatan yang cukup untuk berlangsungnya reaksi kompleksasi pada permukaan elektroda. Dengan maksimalnya ion merkuri yang berada didalam elektroda maka arus redoksnya juga makin besar, sehingga menghasilkan puncak arus yang semakin tinggi. Namun pada waktu akumulasi yang lebih besar dari 3 menit diamati kenaikan puncak arus menjadi tidak signifikan, hal ini dimungkinkan karena pada waktu tersebut jumlah Hg^{2+} yang tereduksi sudah maksimum pada permukaan elektroda.

Pengaruh scan rate. Pengaruh *scan rate* terhadap tinggi puncak arus ditunjukkan pada Gambar 9. Dapat dilihat bahwa *scan rate* yang makin besar menghasilkan kenaikan puncak arus yang makin besar pula. Hal ini sesuai dengan persamaan Randles-Sevcik dimana arus (I_p) sebanding dengan akar pangkat dua dari *scan rate*, seperti dibawah ini:

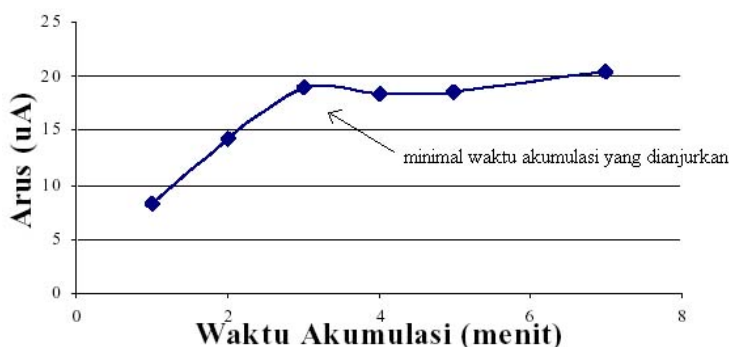
$$I_p = (2,99 \times 10^5) n(na)_{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2}$$

I_p : arus puncak (anodik), n : elektron yang terlibat, A : luas permukaan efektif elektroda, C : konsentrasi analit, D : koefisien difusi, dan V : *scan rate*.

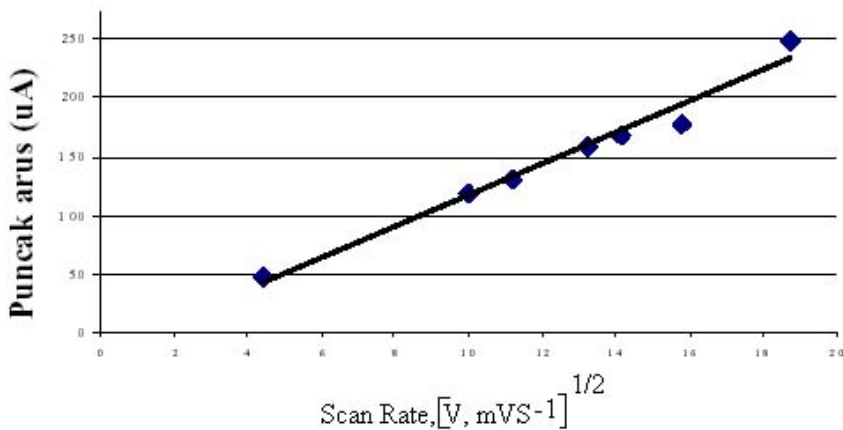
Grafik tinggi puncak arus terhadap $V^{1/2}$ memiliki kelinieran yang baik, $r = 0,988$, menandakan berlangsungnya komunikasi antara elektroda dengan ion Hg^{2+} seperti yang dihipotesakan pada bagian pendekatan konseptual. Kenaikan tinggi puncak arus dengan bertambahnya *scan rate* sangat berhubungan dengan laju elektrolisis pada permukaan elektroda. Elektrolisis yang terjadi pada permukaan elektroda dalam merespon perubahan potensial mengakibatkan sistem akan berusaha menjaga keseimbangan



Gambar 7. Pengaruh potensial awal dimulainya siklik voltametri pada elektroda karbon paste yang dimodifikasi kaliks(6)aren terhadap tinggi arus puncak, diukur pada larutan yang mengandung ion $Hg^{++} 1 \times 10^{-4} M$, 0,1M KI, bufer asetat pada pH 5.



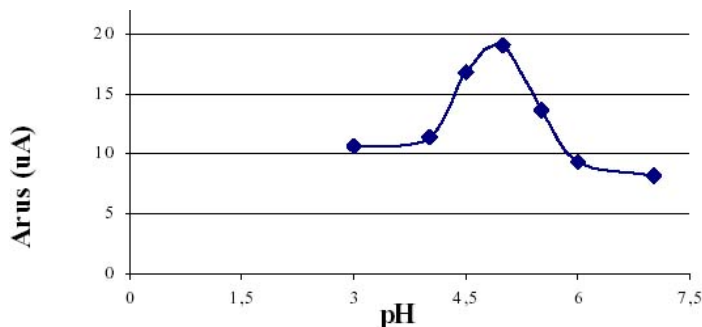
Gambar 8. Pengaruh waktu akumulasi sebelum dimulainya siklik voltametri pada elektroda karbon paste yang dimodifikasi kaliks(6)aren terhadap tinggi arus puncak, diukur pada larutan yang mengandung ion $Hg^{++} 1 \times 10^{-4} M$, 0,1M KI, bufer asetat pada pH 5



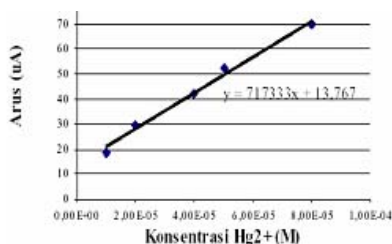
Gambar 9. Pengaruh *scan rate* terhadap tinggi puncak arus pada elektroda karbon paste yang dimodifikasi kaliks(6)aren terhadap tinggi arus puncak, diukur pada larutan yang mengandung ion $Hg^{++} 1 \times 10^{-4} M$, 0,1M KI, bufer asetat pada pH 5

konsentrasi spesi yang teroksidasi dan tereduksi. Hubungan $V^{1/2}$ terhadap tinggi puncak arus mempunyai nilai yang sesuai dengan persamaan Nerst, maka semakin cepat laju potensial laju elektrolisis makin cepat dan

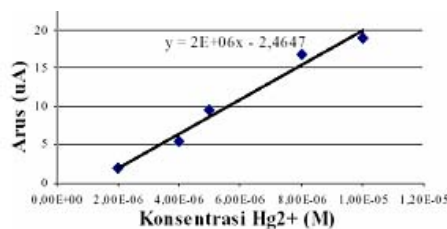
arus makin besar. *Scan rate* juga berpengaruh pada lapisan difusi. Jika *scan rate* makin bertambah maka lapisan difusi makin berkurang dan ini menyebabkan bertambahnya arus.



Gambar 10. Pengaruh pH terhadap tinggi puncak arus pada elektroda karbon paste yang dimodifikasi kaliks(6)aren terhadap tinggi arus puncak, diukur pada larutan yang mengandung ion Hg^{2+} 1×10^{-4} M, 0,1M KI



Gambar 11. Kurva kalibrasi antara besarnya arus puncak terhadap berbagai konsentrasi larutan Hg^{2+} (1×10^{-5} M hingga 8×10^{-5} M), 0,1M KI dan bufer asetat.



Gambar 11. Kurva kalibrasi antara besarnya arus puncak terhadap berbagai konsentrasi larutan Hg^{2+} (2×10^{-6} hingga 1×10^{-5} M), 0,1M KI dan bufer asetat.

Pengaruh pH. Pengaruh pH terhadap tinggi puncak arus dilakukan pada kondisi pengukuran yang optimum, yaitu dengan potensial awal -0,8 V, waktu akumulasi 3 menit dan scan rate 100 mV/s. Gambar 10. menunjukkan pengaruh pH terhadap puncak arus dimana puncak arus maksimum terjadi pada pH 5. Pada pH yang lebih rendah dari pH 5 terjadi penurunan tinggi puncak arus, ini disebabkan karena terjadi protonasi pada ligan (Kong *et al.*, 2002) sehingga mengurangi kemampuan kaliks(6)aren untuk mengikat Hg^{2+} . Pada pH yang lebih besar dari pH 5 juga terjadi penurunan tinggi puncak arus, ini disebabkan karena kemungkinan dapat membentuk $Hg(OH)_2$ yang tidak dapat berikatan dengan kaliks(6)aren.

Kalibrasi, batas deteksi dan presisi. Kurva kalibrasi pada rentang konsentrasi 1×10^{-5} M hingga 8×10^{-5} M Hg^{2+} dapat kita lihat pada Gambar 11. Pengukuran dilakukan pada kondisi pengukuran optimal dengan potensial awal -0,8 V, waktu akumulasi 3 menit dan scan rate 100mV/s, pH 5 dan dalam elektrolit 0,1M KI. Diamati bahwa pada daerah konsentrasi 1×10^{-5} M hingga 8×10^{-5} M mempunyai kelinieran, $r = 0,9946$. dari data tersebut dapat dibuat persamaan linier untuk arus, $I_p [\mu A] = 717333C[M] + 13,77$.

Dari Gambar 12 dapat kita lihat bahwa pada daerah konsentrasi 2×10^{-6} hingga 1×10^{-5} M mempunyai kelinieran, $r = 0,9894$. dari data tersebut dapat dibuat persamaan linier untuk arus, $I_p [\mu A] = 2 \times 10^6 C[M] - 2,4647$. Dari data tiga standar deviasi untuk lima kali pengukuran 1×10^{-5} , 5×10^{-6} , dan 2×10^{-6} , batas deteksi untuk elektroda karbon pasta yang dimodifikasi kaliks(6)aren, yaitu $LOD = 1,29 \times 10^{-6}$ M. Presisi pengukuran ditentukan dengan nilai standar deviasi relatif (RSD). Hasil pengukuran 1×10^{-5} M Hg^{2+} dengan elektroda karbon pasta yang dimodifikasi kaliks(6)aren sebanyak tujuh kali memiliki $RSD = 2,51\%$.

4. Kesimpulan:

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan beberapa hal berikut:

- Telah berhasil dibuat elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren (EKPM-Kaliks-6), dimana elektroda ini memberikan respon yang spesifik terhadap ion merkuri didalam air.
- Komposisi optimum elektrode karbon pasta yang menghasilkan hambatan listrik yang rendah dan sifat fisik yang baik adalah 0,20; 0,43; 0,07 untuk karbon, resin dan hardener. Sedangkan

untuk elektrode karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren, jumlah kaliks(6)aren yang paling optimum adalah 1,09%.

- Elektrode karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren menghasilkan kurva siklik voltametri yang khas terhadap keberadaan Hg^{2+} dalam larutan, sementara respon serupa tidak dijumpai pada elektroda karbon pasta yang tidak dimodifikasi.
- Kondisi optimum untuk pengukuran Hg^{2+} pada elektrode karbon pasta yang dimodifikasi dengan kaliks(6)aren yaitu, potensial awal -0,8 V, waktu akumulasi 3 menit, *scan rate* 100 mV/s dan pH 5 dalam elektrolit 0,1M KI.
- Hasil pengukuran dengan elektrode karbon pasta yang dimodifikasi kaliks(6)aren memiliki presisi, RSD = 2,51% dan batas deteksi $1,29 \times 10^{-6} M$.

5. Ucapan Terimakasih:

Penelitian ini didanai program RUT XI (2004-2005), KMNRT-LIPI, untuk pengembangan sensor elektrokimia portable [PI: J.G.]. Authors would like to thanks to Osaka Gas Foundation for International Cultural Exchange for providing VersaStat II Electrochemical Work Station, which makes this work possible.

6. Daftar Pustaka:

- Abbaspour, A dan Moosavi.S.M.M. (2002): "Chemically Modified Carbon Paste Electrode for Determination of Copper(II) by Potentiometric Method". *Talanta* (56), 91-96.
- Baldwind, Richard.P, dkk. (1986): "Voltametric Determination of Traces of Nickel(II) at a Chemically Modified Electrode Based on Dimethylglyoxime Containing Carbon Pasta" *Anal. Chem.* (58), 1790-1798.
- Huang,Wensheng dan Zhang, Shenghui. (2002) : "Determination of Mercury at a DithizoneModified Glassy Carbon Electrodeby Anodic Stripoping Voltammetry". *Analytical Science*,18
- Hurlbut.JR, Cornelius S. (1971): Dana.s Manualof Mineralogy. John Wiley&Sons, London: 242.
- Khoo,S.B dan Guo, S.Xuan.(1999) : "Rapidly Renewable and Reproducible Electropolymerized Surface at a Monomer Modified Carbon Paste Electrode". *J. Electroanalytical chemistry* (465), 102-103.
- Tae Kong, Young., Jun Bae, Yun., Bo Shim,Yoon.(2002): "Determination of Hg^{2+} Ions Using a Modified Glassy Carbon Electrode with 2,2':6':2-Terpyridine.Bull.Korean Chem.Soc,23.Ste'phane Le Gac,† Xianshun Zeng,† Olivia Reinaud,‡ and Ivan Jabin*(2005): "Synthesis and Conformational Study of the First Triply BridgedCalix[6]azatubes", *J. Org. Chem.*, 70, 1204-1210
- Gunlazuardi J.et al (2005): "Electrochemical Sensing Employing Calyx(6)Aren Modified Carbon Paste Electrode In The Present of Metal Ions" *Manuscript in preparation.*

Sifat dan Ciri Tanah Bris di Setiu, Terengganu

Nurulhuda Edy Muslim, Jumaat Hj. Adam, Muhamad Barzani Gasim, Sahibin Abd. Rahim, Jumat Salimon, Geri Gopir, Ramlan Omar dan Marlia Mohd Hanafiah

Pusat pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam,
Fakulti Sains dan Teknologi, UKM, 43600 Bangi.
nurulhuda194@yahoo.com

Abstrak

Istilah tanah BRIS (*Beach Ridges Interspersed with Swales*) menggambarkan tanah endapan pasir laut. 31% daripada kawasan benua di bumi yang mempunyai keluasan sebanyak 48,000,000 km² adalah terdiri daripada kawasan berpasir. Tanah Bris mempunyai taburan yang meluas di pantai Timur Semenanjung Malaysia terutamanya di Kelantan, Terengganu, Pahang dan Johor. Tanah bris selalunya terdapat di antara 0.2-8.0 km dari pantai. Tekstur tanah bris yang sangat berpasir mempunyai kandungan nutrien N,P, K, Mg dan Ca yang rendah, saliran yang rendah dan struktur tanah yang lemah. Mengikut kajian yang dilakukan, daripada segi taburan saiz kumin, kandungan pasir di dalam tanah bris ialah melebihi 97 %, kelodak 0-1% dan lempung kurang daripada 3%. Keupayaan tanah memegang kation dan keupayaannya memegang air juga rendah. Kandungan karbon organik rendah iaitu kurang daripada 1% dan nilai pHnya <5.0. Oleh itu, didapati kawasan tanah bris hanya ditumbuhi dan didominasi oleh *Casuarina equisetifolia*, *Melaleuca leucodendron*, *zizypus sp.*, *Beckia frutescens*, *Reminea maritima* dan *Fimbristylis sp.* serta beberapa jenis rumput sahaja. Pokok-pokok ini tidak dapat mengeluarkan bahan organik yang mencukupi untuk keperluan tanaman. Namun, hasil daripada teknologi yang semakin canggih dan pembajaan sepenuhnya, tanah bris telah ditanam dengan pelbagai jenis tanaman komersial seperti *Anacardium occidentale* (gajus), tembakau, *Cocos mucifera* (kelapa) dan sayur-sayuran. Kegiatan utama penduduk kawasan Setiu adalah pertanian. Data gunatanah pertanian 1997 menunjukkan adanya pertambahan kawasan pertanian sebanyak 43,935 hektar berbanding tahun 1990 iaitu 40,204 hektar. Pertambahan ini berlaku sejajar dengan kecanggihan teknologi dan peruntukan yang disediakan oleh kerajaan. Manakala kawasan hutan telah diteroka menyebabkan keluasannya berkurangan daripada 65,771 hektar pada tahun 1990 kepada 59,393 hektar pada tahun 1997.

1. Pendahuluan

Tanah bris jarang dijumpai di kawasan pantai Barat Semenanjung Malaysia lantaran ombaknya yang kurang kuat dan tidak dapat melarikan Lumpur (Shamsudin,1990). Menurut Chai dan Samat (1984), kawasan tanah bris meliputi hampir kira-kira 155, 400 hektar di Semenanjung Malaysia dan 40, 000 hektar di Sabah. 31% daripada kawasan benua di bumi yang mempunyai keluasan sebanyak 48,000,000 km² adalah terdiri daripada kawasan berpasir. (Nossin 1964). Tanah bris yang terdapat di permatang pasir yang berhampiran

dengan pantai terdiri daripada 7 siri tanah iaitu Rusila, Merchang, Rhu Tapai, Rompin, Rudua, Baging dan Jambu. Pada dasarnya tanah bris mempunyai tahap kesuburan yang rendah. Tanah bris selalunya terdapat di antara 0.2-8.0 km dari pantai. Tekstur tanah bris yang sangat berpasir mempunyai saliran yang rendah dan kandungan nutrien N,P, K, Mg dan Ca yang rendah disebabkan struktur tanahnya yang lemah menghalang penyerapan nutrien. Keupayaan tanah memegang kation dan keupayaannya memegang air juga rendah. Kandungan karbon organik rendah iaitu kurang

daripada 1% dan nilai pHnya <5.0 (Shamsudin 1990 & Mabaso et al. 2003).

Tanah pasir tidak berfungsi secara kimia. Komposisinya semata-mata silika yang tidak mempunyai sumber cas untuk memerangkap nutrien bagi kegunaan tumbuhan (Courtney & Trudgill, 1984). Tanaman yang ditanam pada tanah ini dijangka mengalami simptom kekeringan walaupun bukan dalam musim kemarau.

Oleh itu, kawasan tanah bris hanya didominasi oleh tumbuhan seperti *Casuarina equisetifolia*, *Melaleuca leucodendron*, *zizypus sp.*, *Beckia frutescens*, *Reminea maritima* dan *Fimbristylis sp.* serta beberapa jenis rumput sahaja. Pokok-pokok ini tidak dapat mengeluarkan bahan organik yang mencukupi untuk keperluan tanaman. Komuniti tumbuhan yang turut dijumpai pada jenis tanah ini berbeza bergantung kepada ciri fizikal dan kimia tanah (Noraini, 1992 & Jumaat, H.A. 1996). Ketinggian pokok adalah berkadar songsang dengan peningkatan altitud. Penstratuman hutan di altitud rendah dipenuhi oleh pokok-pokok sehingga ketinggiannya lebih kurang 20 m manakala di zon puncak terdiri daripada pokok renek sehingga 6 m (Md. Kamaru Al – Amin, 1984). Bilangan spesies pokok semakin berkurang dengan peningkatan altitud tetapi bilangan pokok bertambah dan pokoknya menjadi rapat (Jumaat & Md. Kamaru, 1999).

Pelbagai usaha dijalankan bagi mengatasi masalah ini seperti mengadakan sistem perparitan dan pembajaan. Kajian juga pernah dilakukan iaitu dengan menggunakan kek enap cemar kilang minyak sawit (POME) (Aminuddin.Y, Abdullah C.T et al. 1994) sebagai bahan pembaik tanah, meningkatkan hasil tanaman di tanah bris sekurang-kurangnya dua kali ganda. Kaedah ini berupaya meningkatkan keupayaan pertukaran kation dan kandungan karbon organik tanah. Selain itu ia mengurangkan larut lesap nutrien fosfat, dan menambahkan kandungan nutrien dalam larutan tanah (Aminuddin.Y, Abdullah C.T et al. 1994). Sehubungan itu, kajian ini diharap dapat memberi cadangan mengenai ciri fiziko-kimia tanah dan morfologi sekitaran bagi ekosistem tanah bris dan perubahan yang berlaku ke atas kawasan kajian dari segi relief setempatnya serta jumlah nutrien yang terkandung di dalam tanah di sekitaran.

2. Metodologi Kajian

Lokasi kajian terletak di Daerah Setiu, Terengganu. Daerah ini mempunyai keluasan 126,885 hektar dan 16.07% darinya iaitu 20,396 hektar adalah kawasan pertanian (JPN, 2000). Kawasan Setiu merupakan kawasan pesisir pantai yang datar dan berpasir. Bukit yang tertinggi yang didapati di kawasan ini ialah Bukit Bidong Barat (180m) manakala bukit-bukit lain adalah lebih kurang daripada 60m tingginya. Kawasan ini dibentuk dari mendapan Kuarter yang terdiri dari pasir, lempung, gambut dengan sedikit kerikil. Data-data mengenai profil tanah, siri tanah dan jenis tumbuhan serta tanaman diambil daripada Jabatan Pertanian Daerah dan Negeri, Terengganu. Data-data ini kemudiannya dikumpul, dianalisis dan ditafsirkan.

Persampelan di lapangan.

Persampelan tanah dilakukan mengikut sistem grid di mana sub plot dibuat berukuran 10m x 10m per sampel. Persampelan sistematik dilakukan yang meliputi keseluruhan kawasan di mana titik persampelan terletak pada selang yang tetap pada sistem grid. Persampelan dilakukan di bahagian bawah permukaan tanah yang diambil pada kedalaman 10 cm hingga 20 cm dengan menggunakan auger tangan. Sampel yang diperolehi dimasukkan ke dalam beg plastik berlabel dan di bawa ke makmal untuk dikeringkan dan dilakukan analisis fizikal dan kimia. Pengenalpastian profil tanah dilakukan di lapangan serta mencatat topografi setempat dan bentuk muka bumi kawasan kajian. Komuniti tumbuhan juga dilihat bagi mengetahui spesies dominan dan boleh beradaptasi dengannya.

3. Hasil dan Perbincangan

Tinjauan awal telah dilakukan pada 10 Mei – 17 Mei, 2004. Hasil tinjauan tersebut didapati vegetasi tumbuhan yang dominan di tanah bris yang terdapat di Setiu adalah *Casuarina equisetifolia*, *Melaleuca leucodendron*, *zizypus sp.*, *Beckia frutescens*, *Reminea maritima* dan *Fimbristylis sp.* serta beberapa jenis rumput sahaja. Sebanyak 15 sampel tanah diambil di setiap sub plot yang terpilih. Setelah dianalisis, didapati tekstur tanah di Setiu adalah daripada tanah jenis berpasir kerana mempunyai lebih daripada 90 % kandungan pasir. Menurut Shamsudin 1981, tanah yang mempunyai kandungan pasir melebihi 70% mempunyai

rongga makro yang baik untuk pengudaraan tetapi tidak baik untuk keupayaan menyimpan air bagi kegunaan tumbuhan.. Kedudukan kawasan ini berada lebih kurang pada garis lintang 5°30'39 U dan garis bujur 102°57'55 T.. Didapati aras air tanah berada pada kedalaman di antara 60-70 cm dari permukaan tanah walaupun dalam keadaan kemarau. Tanah ini berwarna coklat gelap ke kekelabuan.

Tanah bris di Setiu adalah terdiri daripada Siri Rudua dan Rhu Tapai (JPN, Terengganu).. Bagi profil Rudua, tekstur lapisan atas (0-15cm) mempunyai ciri-ciri coklat ke kelabu (10 YR 5/2); pasir kasar, berstruktur butir tunggal, gegai dan mempunyai garisan sempadan yang jelas. Manakala tekstur lapisan (15 – 40 cm) berwarna coklat cerah ke kelabu (10 YR 6/2); pasir kasar, berstruktur butir tunggal dan gegai.

Sebanyak 4 lokasi yang dipilih iaitu Stesen 1 di Stesen Komoditi Rhu Tapai (A), Stesen 2; Penanaman Kelapa Sawit (B), Stesen 3; Lembah Bidong(Kawasan tumbuh semulajadi) (C) dan Stesen 4; Kg.Rhu Tapai (D) dan Kg. Penarik (E).

Jadual 1 menunjukkan penentuan pH, Kekonduksian Elektrik ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Al^{3+} , H^+ , dan jumlah Kapasiti Pertukaran Kation (KPK). Secara keseluruhan, didapati nilai pH sampel tanah adalah berjalat daripada 3.60 hingga 4.56 dengan purata 4.02 ± 0.28 . Secara amnya, didapati keasidan tanah di kawasan Setiu adalah tinggi ($\text{pH} < 4.0$). Sampel A2 iaitu di Stesen Komoditi Rhu Tapai, menunjukkan nilai tertinggi iaitu 4.56 manakala sampel E1 menunjukkan nilai pH terendah. Menurut Parker (1991), pH yang sesuai untuk tanaman ialah 5.8 – 6.5 kerana pada peringkat ini, zat makanan untuk tumbuhan tersedia dengan banyak dan akar-akar tumbuhan paling aktif apabila pH lebih daripada 5.8. Analisis korelasi menunjukkan tiada hubungan yang signifikan antara pH dengan peratus bahan organik (%BOT) pada aras bererti 5% ($r = -0.1254$). Sampel B1, B2, D2 dan D3 didapati tiada kehadiran Al^{3+} . Ion Al^{3+} dan H^+ adalah sumber keasidan tanah. Sampel E2 dan E3 mempunyai kandungan Al^{3+} yang tertinggi dengan purata 1.70 ± 1.61 meq/100g. Kekonduksian elektrik berjalat di antara 1060 $\mu\text{S}/\text{cm}$ hingga 2850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ dengan purata 2093 ± 553.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Sampel E2 iaitu di Kampung Penarik menunjukkan nilai

kekonduksian elektrik tertinggi iaitu 2850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ manakala sampel D2 menunjukkan nilai kekonduksian elektrik terendah iaitu 1060 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Pada umumnya nilai kekonduksian elektrik yang tinggi dalam tanah akan menjejaskan pertumbuhan tanah.(Ponnamperuma & Solivan 1981). Nilai kekonduksian tanah berada dalam julat indeks 1-5 di mana indeks 1-3 berkemungkinan merosakkan tumbuhan. Manakala nilai kapasiti pertukaran kation adalah berjalat 6.960 – 30.880 meq/100g tanah dengan purata 12.808 ± 7.860 meq/100g menunjukkan keupayaan tanah memegang kation dan keupayaannya memegang air juga rendah. Analisis korelasi menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara KPK dengan peratus bahan organik pada aras bererti 5% ($r = -0.1468$). Pada dasarnya tanah bris mempunyai tahap kesuburan yang rendah. Data analisis juga menunjukkan purata kandungan nutrien K, Mg dan Ca di kawasan Setiu adalah rendah disebabkan struktur tanahnya yang lemah menghalang penyerapan nutrien. Di Kampung Penarik(E) mencatatkan nilai KPK, kekonduksian elektrik dan kandungan nutrien yang tinggi berbanding kawasan lain. Ini kerana tanah di kawasan ini didapati berwarna agak gelap dan subur berbanding tanah di kawasan lain. Menurut kajian pada masa lalu, penanam tembakau cuba mengatasi masalah tanah bris dengan menyodok lapisan atas tanah bris supaya akar tanaman tembakau mendekati lapisan spodik dan aras air bawah tanah (Aminuddin *et.al.* 1984; Yeoh 1986). Lapisan spodik terdiri daripada campuran pasir dan jirim organik yang bersepadu dengan Al^{3+} dan Fe^{3+} . Lapisan yang berwarna kelabu kehitaman ini didapati lebih subur daripada lapisan lain (Aminuddin *et.al.* 1985). Oleh itu berkemungkinan di kawasan ini penduduknya telah melakukan perkara yang sama memandangkan di sini terdapat beberapa ladang tembakau yang telah lama diusahakan. Kebanyakan penduduk di kawasan ini didapati menanam pokok gajus, pokok kapas, mangga dan kelapa.

Menurut laporan yang diambil daripada Jabatan Pertanian (1997) dan Wong (1974), aktiviti pertanian telah bertambah seiring dengan sektor perindustrian berbanding tahun 1966 dan 1997. Pada tahun 1966, aktiviti pertanian yang dijalankan adalah seluas 19 130 ha dan sektor

perindustrian pula seluas 327 ha berbanding pada tahun 1997 iaitu seluas 96 745 ha dan 4 455 ha. Oleh itu pelbagai langkah telah dilaksanakan oleh kerajaan bagi meningkatkan lagi hasil pertanian di daerah ini. Sebagai contoh, di Stesen Komoditi Rhu Tapai (A), tanahnya telah disuburkan dengan kaedah POME sebagai bahan pembaik tanah dan meningkatkan hasil tanaman di tanah bris sekurang-kurangnya dua kali ganda. Stesen ini menjalankan beberapa jenis tanaman komersial iaitu kelapa pandan, nenas, sukun, gajus, pokok kapas dan beberapa jenis cili. Walaupun tanah di sini mempunyai tahap keasidan yang tinggi iaitu $\text{pH} < 4$, usaha telah dilakukan bagi mengatasi masalah ini dengan pengapuran tanah di dalam lubang penanaman yang dilakukan dengan kadar 1-2kg/lubang, diberi 2-4 minggu sebelum ditanam bersama baja fosfat sebanyak 200g/lubang. Di kawasan Penanaman Kelapa Sawit pula, Jabatan Pertanian telah mengorek lubang tadahan air di antara pokok-pokok kelapa sawit ini bagi mengelakkannya mengalami masalah kekurangan air dan meletakkan baja dan nutrien yang mencukupi untuk kesuburan tanah ini. Usaha ini telah dijalankan selama 2 tahun dan telah memberikan hasil yang semakin baik. Manakala di Kg. Rhu Tapai, walaupun tanahnya agak kurang subur, namun penduduk tempatan tetap menanam pokok yang sama seperti di Kg Penarik di kebanyakan kawasan rumah mereka dengan menggunakan baja untuk menyuburkan tanah. Selain daripada penggunaan baja, tumbuhan yang ditanam ini telah resistan dan boleh beradaptasi dengan keadaan tanah bris.

4. Kesimpulan

Kajian mengenai sifat tanah bris ada dilakukan oleh Jabatan Pertanian. Namun tiada kajian terperinci yang dijalankan bagi menentukan peranan faktor kepelbagaian ekologi khususnya dalam aspek hidrologi, faktor edafik dan iklim, dan juga ke atas variasi fisiognami, komposisi, corak dan kepelbagaian spesies serta kitaran nutrien bagi spesies tumbuhan di kawasan tanah rendah yang mengandungi tanah bris di Malaysia. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa dengan faktor pembangunan dan manusia, tekstur tanah bris telah mengalami perubahan yang ketara. Kegiatan pertanian juga telah makin meluas seiring dengan kepesatan sektor perindustrian di daerah ini. Selain itu,

hasil kajian juga menunjukkan sifat dan ciri tanah bris dan tumbuhan yang dominan di atasnya. Oleh itu diharap kajian ini dapat menyumbang penambahan maklumat mengenai tanah bris dan membantu kepada langkah yang berkesan bagi meningkatkan kesuburannya di Malaysia. Dengan tahap pengurusan, teknologi dan pembajaan yang cekap tidak mustahil tanah bris dapat menjadi tapak pertanian yang mempunyai hasil yang menguntungkan. Pemantauan ke atas tanah dapat memberi maklumat yang bernilai yang boleh mengesan perubahan, penilaian ke atas kesan yang timbul akibat daripada gangguan samada semulajadi ataupun oleh aktiviti manusia.

5. Rujukan

Aminuddin.Y, Abdullah C.T, Ahmad, A.R Md Yunus, J. Wan Zaki, W.M. dan Kamaruddin, A.R.(1994). Peningkatan kesuburan tanah bris dan hasil tembakau dengan kek enapcemar kilang minyak sawit. MARDI.

Chai ,T.B. and Samat,W. (1984). Masalah-masalah penanaman gajus di tanah bris. *Tek. Pert.*,5(2);178-189.

Courtney, F.M. & Trudgill, S.T.1984. The Soil.Ed.Ke-2. London:Hodder & Stoughton.

Laporan Kesesuaian Tanah Projek Kelompok Tanaman Kelapa Pandan Kg. Beris Meraga, Mukim Kijal, Kemaman. (2000). Pejabat Pertanian Daerah Kemaman.

Mabaso, M.L.H, Appleton, C.C, Hughes, J.C, Gouws, E. (2003). The effect of soils type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-Natal, South Africa. *Tropical Medicine & International Health.*, Vol.8 Issue 8, p722,6p.

Noraini J. (1992).Pembangunan Perindustrian di Kawasan Kemaman, Kerterh dan Paka dan Kesannya Ke Atas Persekitaran dan Sumber Asli. *Symposium Sumber Alam Kebangsaan Pertama* pg. 47-60.

Nossin, J.J (1964). Beach Ridges of the East Coast of Malaya. *J. Trop. Geog.*, 18: 111-117.

Penyiasatan Gunatanah Tahun (1990 & 2000), Jabatan Pertanian Negeri Terengganu.

Ponnamperuma, F.N. & Solivan, J.L.1981. Varietal reaction of rice to iron toxicity on acid sulfate soil. Proc.Bangkok Symposium on Acid Sulfate Soils. Dost,H. & Van Breeman,H (Edi.) Ilri Publi.31.

Shamsudin Jusop (1990). Sifat dan Pengurusan Tanah di Malaysia. Dewan Bahasa dan Pustaka.

Nurulhuda Edy Muslim, Jumaat Hj. Adam, Muhamad Barzani Gasim, Sahibin Abd. Rahim, Jumat Salimon, Geri Gopir, Ramlan Omar dan Marlia Mohd Hanafiah

Wong, I.F.T (1974). The Present Land Use of *Peninsular Malaysia.Vol. 1.*
Peninsular Malaysia. *Ministry of Agriculture,*

LAMPIRAN

Jadual 1 : Penentuan pH, Kekonduksian Elektrik ($\mu\text{S/cm}$), Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Al^{3+} , H^+ , dan jumlah Kapasiti Pertukaran Kation.

Sampel	pH	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+	Al^{3+}	H^+	KPK	KE	%Kandungan Lembapan	%BOT
A1	4.04	2.970	0.271	1.052	4.133	1.80	0.90	11.126	2330	4.6247	4.6089
A2	4.56	1.195	0.203	3.960	6.751	0.70	0.60	10.035	2410	4.0343	4.0261
A3	3.95	7.400	2.123	1.092	5.204	1.50	1.00	18.319	2430	4.0276	4.0222
B1	4.18	3.060	0.110	2.017	3.171	UD	0.50	8.858	1330	4.0109	3.9759
B2	4.21	1.934	0.100	0.760	5.111	UD	0.40	8.306	2280	4.0128	3.9671
B3	4.06	1.253	0.697	0.578	3.532	0.50	0.40	6.960	1340	4.3756	4.3809
C1	3.65	0.690	1.425	1.030	4.166	2.10	1.20	10.611	2090	4.0566	4.0590
C2	3.79	0.755	1.290	0.814	2.831	1.40	1.30	8.389	2240	4.7581	4.7561
C3	4.25	1.122	1.349	0.930	3.194	1.60	0.90	9.095	2340	4.6870	4.6693
D1	4.09	1.983	0.320	0.623	3.171	0.70	0.60	7.397	2350	4.3644	4.3649
D2	3.90	2.410	0.157	1.103	3.316	UD	0.40	7.386	1060	4.3541	4.3535
D3	4.03	1.609	0.183	0.586	3.925	UD	0.40	10.077	1290	4.3699	4.3572
E1	3.60	20.400	1.285	2.155	4.202	1.20	1.50	30.742	2610	4.4078	4.3913
E2	4.40	1.048	0.241	0.703	3.647	6.40	1.90	13.939	2850	4.0823	4.0804
E3	3.62	18.270	1.305	1.243	7.362	0.80	1.90	30.880	2450	4.1507	4.1353
Purata	4.02	4.407	0.737	1.243	4.2477	1.70	0.93	12.808	2093	4.2878	4.2765
Sisihan Piawai	0.28	6.291	0.658	0.886	1.334	1.61	0.53	7.860	553.1	0.2580	0.2616

Kajian pencirian sifat fiziko-kimia minyak biji kekabu, *Ceiba petandra*

Khairul Asmak Abd. Kadir dan Jumat Salimon*

Program Oleokimia,
Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

*Corresponding author: e-mail: jumat@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Minyak kasar biji kekabu (*Ceiba petandra*) diesktrak dengan menggunakan pelarut heksana selama 3 jam pada suhu 60 dan 40 °C melalui kaedah pengekstrakan soxhlet. Kandungan lipid kasar, triasilgliserol, asid lemak dan sifat-sifat fizikokimia minyak biji kekabu dikaji. Hasil kajian menunjukkan biji kekabu mengandungi minyak sebanyak 25-30%. Asid lemak linoleik, palmitik dan oleik merupakan asid lemak dominan dalam minyak biji kekabu dengan peratusan sebanyak 42.3%, 22.5% dan 20.9% masing-masing. Ciri-ciri minyak biji kekabu didapati setanding dengan minyak politaktepu (PUFA) bijirin lain.

Key words: Kekabu seed oil, linoleic acid, PUFA

1. Pendahuluan

Malaysia kaya dengan sumber tumbuhan minyak bijian yang belum dieksploitasikan. Sumber-sumber bijian memang dikenal pasti sebagai sumber minyak politaktepu dan masih belum dikaji dengan meluas dan mengakibatkan sumber-sumber minyak ini terbiar dan merugikan. Tumbuhan dari famili Bombacaceae sebagai contoh pokok *Ceiba petandra* atau lebih dikenali sebagai pokok kekabu, mempunyai biji benih yang banyak dalam buah kekabunya yang mungkin boleh dieksploitasi sebagai sumber minyak politaktepu. Pokok kekabu berasal dari Amerika Selatan; dan ianya telah tumbuh dengan meluas di hutan hujan tropika di benua Afrika Barat dan Asia tenggara termasuklah Semenanjung Malaysia and Indonesia. Bentuk buahnya yang penuh dengan gentian kapas/kekabu dan biji benih yang banyak, kira-kira 40% dari keseluruhan isi buah. Gentian kekapas/kekabu ini telah lama digunakan sebagai pengisi bantal dan tilam, bahan penebat haba, bahan pengapung dalam jaket keselamatan dinegara-negara Asia Tenggara disebabkan sifatnya yang tahan haba, terapung dan kalis air serta ringan, sedangkan biji buah kekabu dibuang begitu sahaja [1].

Sumber dari bahan rujukan bukan saintifik dan hasil kajian awal yang telah dijalankan menunjukkan bahwa biji kekabu mengandungi lipid kasar sekitar 25% dari berat keringnya. Minyak yang berwarna "brownish-yellow" bersifat cecair disuhu bilik dan suhu peti sejuk menunjukkan minyak ini mengandungi asid-asid lemak yang tinggi darjah ketaktepuannya. Kertas kerja ini melaporkan pengekstrakan minyak biji kekabu dan pencirian sifat-sifat fizikokimia minyak biji kekabu.

2. Percobaan

Penyediaan sampel kekabu

Buah kekabu yang cukup tua dan matang telah dikutip dari beberapa buah kampung didaerah Perak, Pahang and Selangor. Pengecaman species buah kekabu telah dilakukan di herbarium/sepamatophic Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam, Universiti Kebangsaan Malaysia. Biji-biji kekabu dikeluarkan dari pod buahnya dan diasingkan dari gentian kekabu secara manual dan dikeringkan dalam oven pada suhu 30 °C selama seminggu sebelum analisis berikutnya dilakukan.



Rajah 1: Buah kekabu dengan pod buah, gentian kekabu dan biji kekabu

Bahan Kimia

Semua bahan kimia yang digunakan diperolehi dari pembekal tempatan adalah terdiri dari "reagent gred" samada HPLC atau gred analitikal dan digunakan terus tanpa melakukan penulenan semula.

Pengekstrakan lipid/minyak

Pengekstrakan minyak kekabu telah dilakukan dengan menggunakan kaedah piawai yang dicadangkan oleh "Standard Methods for The Analysis of Oils, Fats and Derivatives" 1.122, IUPAC [2]. Biji kekabu yang telah dihancurkan diekstrak dengan menggunakan pelarut hexana (Merck) dan direfluk selama tiga jam pada 60 °C. Pelarut kemudiannya dikeluarkan dengan menggunakan "rotary evaporator". Minyak yang terhasil diletakan dalam ketuhar bervakuum pada suhu 60 °C selama 30 min. dan ditimbang dan seterusnya disimpan dalam peti sejuk untuk analisis selanjutnya.

Penentuan Komposisi Asid Lemak (FAC)

Kandungan dan komposisi asid lemak telah ditentukan dengan menggunakan Kromatografi Gas. Minyak kekabu telah ditukar kedalam bentuk asid lemak metil ester (FAME) dengan menggunakan kaedah. AOCS Cd 14c-94 [3]. 0.05 g sampel diletakkan dalam vial 2 mL yang mempunyai penutup skrew. 0.95 mL *n*-hexana kemudiannya ditambahkan diikuti oleh 0.05 mL larutan natrium metoksida. Larutan campuran kemudiannya digincang dengan menggunakan penggoncang vortex selama sepuluh saat dan dibiarkan selama 15 min. Kira-kira 1 µL larutan organik yang terhasil disuntikkan kedalam peralatan Shimadzu GC-17A FID yang dilengkapi dengan turus capillary BPX 70 (30m x 0.25mm x 0.25µm). Suhu awal turus telah diprogramkan pada 180 °C selama 30 min. dan suhu penyuntik dan pegasan dibiarkan pada suhu 160 °C and 280

°C masing-masing. Gas nitrogen telah digunakan sebagai gas pembawa dengan kadar kelajuan 0.3 ml/min. Pengesanan minyak FAME dilakukan dengan membandingkan puncak-puncak FAME piawai.

Penentuan sifat fisiko-kimia

Indek biasan telah ditentukan dengan menggunakan Atago refractometer pada 28 °C. Nilai-nilai penyabunan, iodin, keasidan, asid bebas dan titik awan minyak kekabu telah ditentukan dengan menggunakan kaedah Porim Test Method [4]. Kandungan air/kelembapan minyak telah ditentukan menggunakan titratan-auto 701 Karl Fisher Tritino Metrohm.

3. Hasil dan Pembahasan

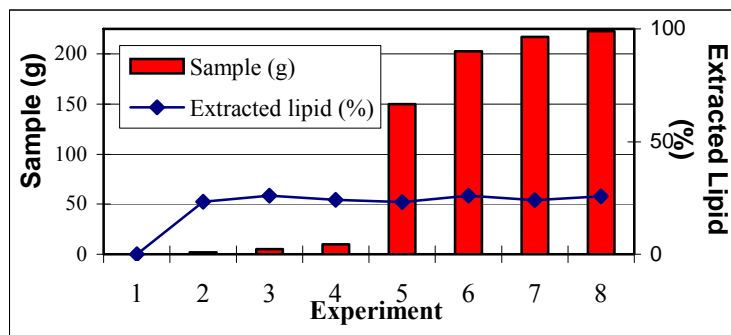
Ciri Fizikal

Buah kekabu secara amnya mempunyai bentuk membujur (oblong) dengan ukuran 6-12 in. dan 2-4 in. jejari, mempunyai lebih kurang 60% gentian kekabu/kelepas yang berwarna kelabu keputihan dan lebih kurang 40% biji benih yang berwarna kelabu kehitaman seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1.

Rajah 2 menunjukkan biji kekabu yang merangkumi kira-kira 30-50 % mengikut berat buah kekabu. Ianya mempunyai bentuk-pear, berwarna dari kelabu hingga "dark-brown" dan mengandungi kira-kira 25-30 % minyak. Sais ukuran biji kekabu berubah mengikut sais buah dan biasanya dalam julat 4-6 mm bergantung kepada jenis, species dan kawasan tanaman.



Rajah 2: Biji kekabu



Rajah 3: Perhubungan berat sampel dan jumlah minyak terekstrak

Jadual 1 : Sifat fiziko-kimia minyak kekabu

Parameter	Average Value
Water content, %	0.04
Refractive Index ^a	1.462
Acid value (mg/g)	30.55
Free fatty acid (% as oleic acid)	15.35
Saponification value (mg/g)	208.49
Average of TAG molecular weight	807.22
Iodine Value (mg/g)	103.66
Cloud point, °C	-4

Jadual 2 : Komposisi asid lemak dalam minyak kekabu dan minyak lain

Seed	Komposisi asid lemak							Reference
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
Oil								
KO	-	0.08	22.5	3.1	20.9	42.3	0.07	^a exp.
CtO	-	0.9	24.7	2.3	17.6	53.3	0.3	[6]
CPO	0.2	1.1	44.0	4.5	39.2	10.1	0.4	[7]
PKO	48.3	15.6	7.8	2.0	15.1	2.7	-	[7]

KO: minyak kekabu, CtO: minyak biji kapas, CPO: minyak sawir mentah, PKO: minyak isirong sawit
^aexp: data hasil kajian ini

Kandungan lipid/minyak

Biji kekabu telah menunjukkan kandungan lipid/minyak yang banyak sekitar 25-30 % mengikut berat. Rajah 3 menunjukkan perhubungan berat sampel biji kekabu dan peratus minyak yang diperolehi dalam jangka masa pengekstrakan yang ditetapkan dan jumlah pelarut berlebihan. Hasil kajian menunjukan bahawa peratus minyak yang diperolehi akan kekal disekitar 25% walaupun berat sampel ditambahkan.

Ciri fiziko-kimia

Minyak kekabu yang diperolehi mempunyai rasa kacang (nut-like) berwarna "brown yellowish" dan bersifat cecair pada suhu bilik (25 °C) dan suhu peti sejuk (4 °C). Jadual 1

menunjukkan beberapa sifat fizik dan kimia minyak kekabu. Peratus kelembapan minyak kekabu adalah rendah pada 0.04 % dan mempunyai nilai indek bias 1.462 pada suhu 28 °C. Purata kandungan asid lemak bebas sebagai peratus asid oleic, berubah dari 3-15 % mengikut tahap kematangan dan kesegaran biji. Proses penulenan seharusnya dijalankan bagi minyak yang menggandunggi peratus asid lemak bebas yang melebihi 5 %. Minyak kekabu menunjukkan nilai iodin yang tinggi iaitu 103.66 mg/g. Julat nilai iodin ini adalah terletak bagi julat minyak separuh-pengeringan (semi-drying oil) dan minyak politaktepu yang tinggi. Minyak kekabu mempunyai nilai penyabunan dalam julat rendah iaitu 208.5 mg/g yang memberikan purata nilai berat

molekul triasilgliserolnya sebanyak 807.22 g/mol.

Kandungan asid lemak

Kandungan dan komposisi asid lemak yang terdapat dalam minyak kekabu dan beberapa minyak makan lain untuk perbandingan ditunjukkan dalam Jadual 2. Hasil kajian menunjukkan bahwa minyak kekabu mengandungi asid lemak major sebagai asid linoleik, C18:2 (42.3%), asid palmitik, C16:0 (22.5%) dan asid oleik C18:1 (20.9%). Asid oleik dan asid linoleik merupakan kandungan asid lemak taktepu merangkumi lebih dari 63% dari jumlah asid lemak. Peratusan asid lemak tepu pula merangkumi kira-kira 25% dari jumlah asid lemak minyak kekabu. Asid lemak tepu ini terdiri dari asid palmitik C16:0 (22.5%), asid sterik, C18:0 (3.1 %) dan asid miristik C14:0 yang jauh lebih rendah sebanyak (0.08 %). Secara perbandingan minyak kekabu mempunyai peratus asid lemak linoleik (42 %) yang menghampiri sifat-sifat minyak biji kapas yang kaya dengan kandungan asid linoleik (53 %) sebagaimana yang ditunjukkan dalam Jadual 2. Oleh itu adalah dijangkakan bahwa minyak kekabu adalah sesuai digunakan sebagai pengganti setiap kegunaan minyak biji kapas yang jauh lebih mahal, terutamanya dalam penggunaan minyak salad dressing, minyak masak, dan juga dalam penyediaan lemak dan margarines [5]. Dengan kandungan asid lemak linoleik yang tinggi, minyak kekabu boleh digunakan sebagai sumber modifikasi minyak lain seperti minyak kelapa sawit dan minyak kernel sawit yang mengandungi 10.1 dan 2.7% asid linoleik masing-masing.

4. Kesimpulan

Kajian awal ini telah menunjukkan bahwa biji kekabu mempunyai peraus minyak terekstrak yang agak tinggi dan mempunyai kandungan asid lemak tak tepu yang tinggi. Peratusan asid lemak linoleik yang tinggi dan komposisi asid lemak lain dalam minyak kekabu menunjukkan minyak kekabu mempunyai ciri-ciri yang hampir sama dengan minyak biji kapas yang jauh lebih mahal. Minyak kekabu mempunyai ciri-ciri minyak yang berpotensi untuk dikomersialkan terutamanya dalam espek sumber asid lemak politektepu seperti asid

lemak linoleik yang penting diambil dalam diet harian [8]. Kajian lebih lanjut perlu dijalankan terutamanya dari espek ketoksikan sebelum ianya dapat digunakan secara langsung sebagai sumber minyak makan seperti minyak “edible” yang lainnya.

5. Ucapan Terimakasih

Setinggi penghargaan diucapkan kepada “Ministry of Science and Technology & Inovasi” (MOSTI) di atas pembiayaan gran penyelidikan IRPA # 09-02-02-0115 EA 277 dan Universiti Kebangsaan Malaysia di atas sebahagian dari pembiayaan Skim Zamalah dan pengajian peringkat sarjana kepada Miss Khairul Asmak Abdul Kadir.

6. Daftar Pustaka

- [1] J.G.Vaughan. 1970. *The Structure and Utilization of Oil Seeds*. Great Britain: The Chaucer Press.
- [2] IUPAC. 1979. *Standard Methods for the analysis of Oils, Fats and Derivatives*. (6th ed). Great Britain: Pergamon Press.
- [3] V.C. Mehlenbacher. 1964. *Official and Tentative Methods of The American Chemists' Society*. 2nd ed. Illinois: American Chemists' Society.
- [4] PORIM Test Method. 1995. Bandar Baru Bangi: Palm Oil Research of Malaysia.
- [5] Luque de Castro, M.D. & Garcia-Ayuso, L.E. 1998. Soxhlet Extraction of Solid Materials: an outdated technique with promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* **369**: 1-10
- [6] Basil S. Kamel & Yukio Kakuda. 1992. Fatty Acids in Food and Their Health Implications, in Ching Kuang Chow (Ed). *Fatty Acids in Fruits and Fruits Products*, pg. 263 – 296. USA: Marcel Dekker, Inc.
- [7] Salmiah Ahmad, Zainab Idris, Rubaah Masri & Rohana Ahmad. 1996. Oleochemicals in Malaysia-Towards Value Addition. *PALM OIL Technical Bulletin* **2**(3):2-5.
- [8] Akoh, C.C. 1998. Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. In Akoh, C.C & Min, D.B. (Ed). *Lipid-Based Synthetic Fat Substitues*, pg 559 - 588. USA: Marcel Dekker, Inc.



Antibacterial Properties Of Chitosan Extracted From *Absidia* sp. DR

D.C. Paul¹⁾, K. Nadarajah²⁾ & J. Kader³⁾

- 1) School of BioSciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi,
Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail: dawner@lycos.com
- 2) School of BioSciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi,
Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail : ps113@lycos.com
- 3) School of BioSciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi,
Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail: jkader@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Five fungal chitosan samples were produced by extracting fungal chitosan from 60-hour old mycelia of *Absidia* sp. DR using different treatment combinations (CTVB, CAA1, CAA2, CFA1 and CHC11). The antibacterial properties of these chitosan samples were tested against seven bacteria (3 Gram positive and 4 Gram negative) by employing the disc diffusion and the minimal inhibition concentration (MIC) determination methods. The fungal chitosan's molecular weight (MW) ranged from 7.4×10^4 to 2.8×10^5 Da whereas the commercial crustacean chitosan MW was 2.2×10^6 Da to 8.1×10^6 Da in size. The degree of deacetylation (DD) for the chitosan samples ranged from 82.08% to 87.31%. It was observed that the fungal and crustacean chitosan generally had similar bacterial inhibition trends whereby Gram positive bacteria were more susceptible to the action of chitosan as compared to Gram negative bacteria. This was especially obvious in the disc diffusion test where only small zones of inhibition were observed (diameters of 7.0 to 9.5 mm) for all samples and concentrations of fungal and crustacean chitosan used in this study. This study also showed that the crustacean chitosan gave the lowest MIC value of 0.078 mg/ml as compared to 0.156 mg/ml given by the fungal chitosan. On the whole, the fungal chitosan CAA1 (DD 82.56%, MW 2.37×10^5 Da) gave the best results when tested against Gram positive bacteria meanwhile CAA2 (DD 87.12%, MW 2.76×10^5 Da) yielded the best results for Gram negative bacteria. From the experimentations conducted we concluded that chitosan with a combination of high degrees of deacetylation and high molecular weight does not necessarily yield better bacterial growth inhibitory effects. The overall bacterial growth inhibitory reaction is also dependent on the interaction between chitosan with the bacteria, and the nature of the target organism.

Keywords: Chitosan, *Absidia* sp., antibacteria, degree of deacetylation, molecular weight

1. Introduction

Chitosan, the deacetylated form of chitin is a highly polycationic biopolymer comprising of (1,4)-linked amino-deoxy- β -D-glucan which is rarely found in nature. However some fungi,

especially Zygomycetes, contain chitosan as the main component of the fungal cell wall (Arcidiacono & Kaplan 1992). At present, chitosan is commercially extracted from the exoskeleton of crustaceans strong alkali.

Chitosan has a massive range of applications in industries such as cosmetics, pharmaceutical, textile, food, biotechnology and agriculture. Physicochemical properties such as the degree of deacetylation and molecular weight dictates the characteristics of chitosan (Arcidiacono & Kaplan, 1992) thus determining its application. Chitosan is surface active compound which falls in the category of cationic antimicrobial agent. The antibacterial and antifungal properties of chitosan has drawn the attention of many researchers to work on developing chitosan as a natural food preservative (Roller & Covill 2000). Much study has been conducted on the the antimicrobial properties of crustacean chitosan and to a lesser extent, fungal chitosan. However many contradictory results were reported in the literature (Sudarshan et al. 1992; Gagne 1993; Jeon et al. 2001). Several studies reported that chitosan with higher molecular weights were able to better inhibit bacterial growth as compared to lower molecular weight chitosan whereas different studies reported otherwise (Jiang et al. 1996; Helander et al. 2001; Jeon et al. 2001). Gagne (1993) and Park et al. (2004) reported that the degree of deacetylation was important in conferring the inhibitory effects of chitosan. Therefore, this study aims to compare the antibacterial properties of fungal chitosan and crustacean chitosan and also to determine the effect of the degree of deacetylation and molecular weight of chitosan to its antibacterial activity.

2. Experimental

Fungi and culture medium

The fungus used in this study, *Absidia* sp. DR, a Zygomycete was obtained from the culture collection of the school of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia. *Absidia* sp. DR was grown on yeast-extract peptone glucose, YPG medium (yeast extract 3gm/l, peptone 10gm/l, glucose 10gm/l and 1 ml/l trace elements) and TVB medium (glucose 20gm/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4gm/l; KH_2PO_4 2 gm/l; CaCl_2 0.3gm/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3gm/l; molybdic acid 85% 0.01gm/l and 1ml/l trace elements) for 60 hours. Both growth media were prepared as 195ml aliquots in 500ml Erlenmeyer flasks and were autoclaved at 110°C, 15 psi for 10 minutes (Arcidiacono & Kaplan 1992). Inocula was prepared aseptically

by adding sterilized distilled water onto the fungal mycelia grown on potato dextrose agar plates (PDA) and then carefully scraping the spores from the mycelia using a stab wire. Spore suspension was filtered into a sterilized flask and spore count was performed using a haemocytometer (Improved Neubauer, 0.100 mm deep, brightline Hemacytometer, USA). The spore suspension was prepared as 1×10^7 spores/ml. 5 ml of spore suspension was inoculated into every flask. The fungus was grown as submerged batch cultures at 30°C and with agitation of 150 rpm for 60 hours and was then harvested using a vacuum filter (Milipore) and Whatman paper No. 1. The fungal biomass obtained was dried in a freeze dryer (Labconco Model 216004) and weighed.

Extraction

Lyophilized fungal biomass was then subjected to methods of White *et al.* (1979) and Rane and Hoover (1993) with several modifications for the extraction of chitosan from the fungus. Three different acids, acetic acid (AA) formic acid (FA) and hydrochloric acid (HCl) were used as the extracting solution. Two combinations of acid treatment were performed: [1] acid concentration 2%, incubation period 12 hours and temperature 95°C, and [2] acid concentration 10%, incubation period 12 hours and temperature 95°C. Five fungal chitosan were produced and designated as CAA1(TVB), CAA1, CAA2, CFA1 and CHCl1. AA, FA and HCl correspond to acetic acid, formic acid and hydrochloric acid respectively with the numbers 1 and 2 indicating the acid treatment combination. With the exception of CAA1(TVB), all fungal chitosans were extracted from mycelia harvested from YPG. Crustacean chitosan (crab) with low (CLMW) and high (CHMW) average molecular weight were obtained from SIGMA whereas shrimp (CMMW) chitosan was obtained from Chitochem (Perak, Malaysia).

Quality and statistical analysis

The degree of deacetylation was determined by the first derivative UV spectrophotometry method (FDUVS) (Muzarelli & Rochetti, 1985). The degree of deacetylation for the chitosan samples was determined based on calculations for the percentage of the glucosamine content in the samples (Muzarelli & Rochetti, 1985). The average molecular

weight was resolved using the intrinsic viscosity method (Rege & Block, 1999). Curves for $\eta_{sp}/\text{concentration}$ versus concentration (whereby η_{sp} - specific viscosity) were plotted and extrapolated in order to obtain the intrinsic viscosity, $[\eta]$ ($[\eta] = [\eta_{sp}/c]_{c \rightarrow 0}$). The average molecular weight was then calculated using the Mark-Houwink equation:

$$[\eta] = KM^a$$

whereby K and a are coefficients related to the Ubbelohde tube and the molecular weight of sample. The colour of chitosan was assessed using a chromameter (Minolta Model CR300, Japan) and the Hunter values for lightness (L) was recorded (Roberts, 1992). Data obtained was analyzed statistically using the Jandel Scientific SigmaStat statistical package.

Bacterial cultures and Antibacterial test

The test bacteria comprising of three Gram positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*) and four Gram negative bacteria (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*) were obtained from the culture collection of the Malaysian Institute of Medical Research (IMR), Kuala Lumpur. Antibacterial properties of fungal and crustacean chitosan were determined through the Kirby-Bauer disc diffusion method and the determination of MIC values (Sudarshan et al. 1992). Measurement of optical density for the growth of bacteria were done at 450 nm for *S. aureus* and 600 nm for

other bacteria.

3. Results and Discussion

Quality analyses

The degree of deacetylation (DD) and molecular weight (MW) of chitosan extracted using the acid treatments are shown in Table 1. It is observed that CFA1 had the lowest DD (82.02%) while CHC11 had the highest DD (87.31%). CAA2 was found to have the highest MW (2.757×10^5 Da) and CHC11 had the lowest MW (6.765×10^4 Da). DD for all three commercial chitosans were about 85% while their MW ranged from 2.216×10^6 Da to 8.099×10^6 Da. This study also observed that the same incubation period, temperature and acid concentration rendered different effects and interactions when different acids were used as the extracting solution. Therefore it can be stated that the difference in the degree of deacetylation and molecular weight attributed by the different acid treatments is due to the difference in the degree of hydrolysis and degradation of the chitosan polymer chain.

Antibacterial properties

Fungal and crustacean chitosan had similar bacterial inhibition trends whereby Gram positive bacteria were more susceptible to the action of chitosan as compared to Gram negative bacteria. This is due to the different mechanism and target of antibacterial activity of chitosan for Gram negative and Gram positive. The cell walls of Gram positive bacteria contains layers of peptidoglycan

Table 1 Degree of deacetylation and molecular weight of chitosan

Chitosan	Intrinsic viscosity [η]	Degree of deacetylation (%)	Values of K and a	Molecular weight (M) Da
AA2% 12 hours 95°C (CAA1)	205.7	82.56	1.424×10^{-3} , 0.96	2.370×10^5
AA10%12 hours 95°C (CAA2)	237.88	86.15	1.424×10^{-3} , 0.96	2.757×10^5
FA2% 12 hours 95°C (CFA1)	101.61	82.02	1.424×10^{-3} , 0.96	1.137×10^5
HCl2%12hours 95°C (CHC11)	61.741	87.31	1.424×10^{-3} , 0.96	6.765×10^4
AA2% 12hours 95°C (CTVB)	78.722	84.55	1.424×10^{-3} , 0.96	8.714×10^4
Chitochem (SC)	2321.4	85.33	1.424×10^{-3} , 0.96	2.959×10^6
SIGMA (LMWC)	1759.2	85.56	1.424×10^{-3} , 0.96	2.216×10^6
SIGMA (HMWC)	6103.8	85.79	1.424×10^{-3} , 0.96	8.099×10^6

comprised of networks which have a great number of pores that enable foreign molecules to enter the cells easily. On the cell surface, chitosan polycations creates a destabilization effect in the outer structure of the cell wall. This shows that there is a strong interaction between chitosan and cell wall surface (Sudarshan et al. 1992). Chitosan is also able to induce extreme morphological changes on Gram positive bacteria due to increased autolysin activities which leads to disruption of the bacterial cell wall (Dagry et al. 2000). However, discussion will only be focused on *S. aureus*, *B. cereus* (Gram positive) and *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* (Gram negative). In the disc diffusion test, the diameters for the zones of inhibition ranged from 7.0 to 9.5 mm for all fungal and crustacean chitosans with the best inhibitory effects obtained at 5mg/ml and 2.5mg/ml chitosan concentrations for both

Gram positive and Gram negative bacteria.

For *S. aureus*, fungal chitosan showed inhibition zones at every concentration except for CHC11 and CAA2 (no zones formed at 0.625mg/ml) (Table). It is interesting to note that both chitosans were found to have the highest DD (Table 1). Results for *B. cereus* (not shown) also showed a similar trend whereby only CHC11 and CAA2 did not exhibit inhibition zones at 0.625mg/ml concentration. Only chitosan with DD ranging from 82.02% to 84.55% gave satisfactory inhibition. CAA1 gave the best inhibitory effect towards *S. aureus* with a zone diameter of 9.0mm at 2.5mg/ml concentration. The SIGMA crustacean chitosans did not inhibit bacterial growth below 5mg/ml concentration. In past studies (Sudarshan *et al.*,1992; Gagne 1993), chitosans with higher degree of deacetylations were said to yield better inhibitory effects as

TABLE 2 Zones of inhibition (mm) for fungal and crustacean chitosan towards *S. aureus*

Chitosan/ Conc. (mg/ml)	10.00	5.00	2.50	1.25	0.625
CTVB	8.00	7.57 ± 0.25	7.57 ± 0.25	7.50	7.00
CAA1	8.50	8.75 ± 0.25	9.00	7.25 ± 0.25	7.25 ± 0.25
CAA2	8.00	8.25±0.25	7.50	7.00	-
CFA1	7.75± 0.25	7.75 ± 0.25	8.00	7.50	6.50
CHC11	8.00	7.75 ± 0.25	7.50	7.00	-
CS	8.00	8.25± 0.25	8.00	8.00	-
CLMW	8.00	8.50	-	-	-
CHMW	8.00	7.75± 0.25	-	-	-

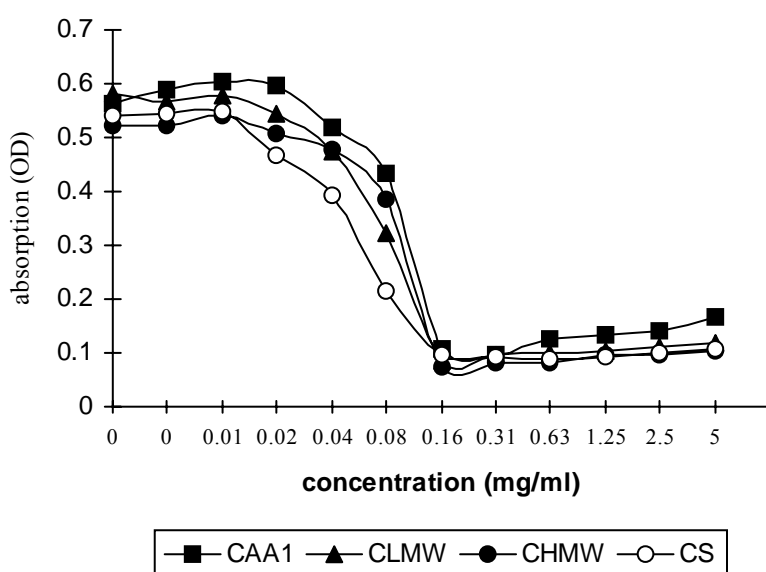
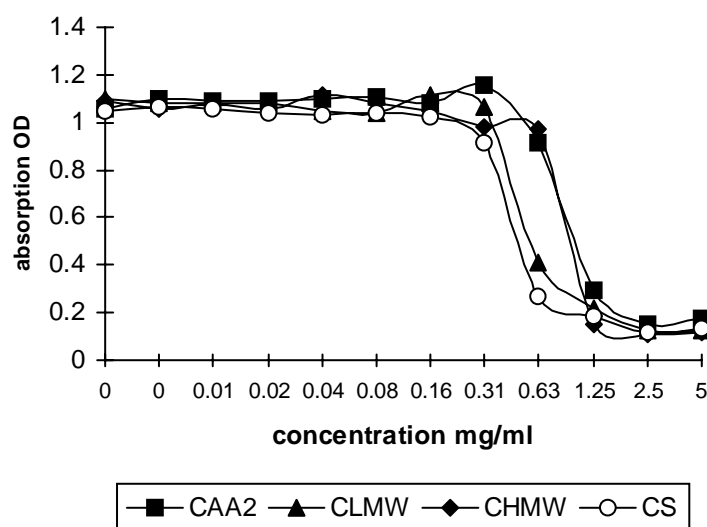


Figure 1 Effects of chitosan towards *B. cereus* after 24 hours

Figure 2 Effects of chitosan towards *P. aeruginosa* after 24 hoursTable 3 Zones of inhibition (mm) for fungal and crustacean chitosan towards *E. aerogenes*

Chitosan/Conc. (mg/ml)	10.00	5.00	2.50	1.25	0.625
CTVB	-	-	-	-	-
CAA1	7.50	8.25±0.25	8.00	-	-
CAA2	-	-	-	-	-
CFA1	-	-	-	-	-
CHC11	-	-	-	-	-
CS	7.50	8.00	7.00	-	-
CLMW	7.50	8.00	7.00	-	-
CHMW	7.50	7.00	7.00	-	-

compared to chitosans with lower degree of deacetylation as they have more reactive groups. DD is important because it determines the polycationic global charges in the chitosan (Gagne 1993). However this study found that CAA1 (82.56%) rendered a higher degree of inhibition as compared to CAA2 (86.15%) and CHC11 (87.31%), both with a higher degree of deacetylation (Table 1, Table 2). This finding is supported by Park et al. (2004) whereby it was discovered that chitosan and chitoologosaccharide gave better antimicrobial effects at DD 75% as compared to a higher DD of 90% and a lower DD of 50%. This means that a specific range of effective DD for antimicrobial activities exists.

In the disc diffusion test conducted against Gram negative bacteria, all chitosan samples did not appear to inhibit the growth of *E. coli* (ATCC 29522) and *S. marcescens* as there were no clear formation of inhibition zones. Past studies reported the efficacy of chitosan as

an antibacterial agent for *E. coli* (Sudarshan et al. 1992). However the inability of chitosan to inhibit *E. coli* in this study might be due to the different bacterial strain used. On the whole it was observed that *E. aerogenes* was more susceptible towards the action of commercial crustacean chitosan which had high MW (2.2×10^6 Da hingga 8.1×10^6 Da). However, CAA1 was the only fungal chitosan able to inhibit *E. aerogenes* whereby inhibition zones were formed at the higher chitosan concentrations (10mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml) with the clearest zone of inhibition with a diameter of 8.25 ± 0.25 mm at 5 mg/ml. Results from this test showed that chitosan with high MW weight was necessary in order to inhibit growth of *E. aerogenes* (Table 3). It is also important to note that DD too played an important role in the inhibitory effect as CAA1 had a lower DD value as compared to CAA2 although CAA2 had a higher MW (Table 1, Table 3). This result again suggests that there is a specific range of DD for effective inhibition. In the case

Table 4 MIC values for fungal and crustacean chitosan after 24 hours bacterial growth

Chitosan/Bacteria	<i>B. c</i>	<i>S. a</i>	<i>S. f</i>	<i>E. a</i>	<i>E. c</i>	<i>P. a</i>	<i>S. m</i>
CTVB (mg/ml)	0.625	0.625	0.625	5	1.25	5	2.5
CAA1 (mg/ml)	0.156	0.156	0.3125	2.5	1.25	2.5	2.5
CAA2 (mg/ml)	0.3125	0.3125	0.3125	2.5	0.625	2.5	2.5
CFA1 (mg/ml)	1.25	0.625	0.625	5	1.25	5	2.5
CHC11 (mg/ml)	0.3125	0.625	0.625	2.5	1.25	2.5	2.5
CLMW (mg/ml)	0.156	0.156	0.3125	2.5	0.078	1.25	2.5
CHMW (mg/ml)	0.156	0.078	0.156	2.5	0.078	1.25	2.5
CS (mg/ml)	0.156	0.078	0.156	2.5	0.078	1.25	2.5

B. c - *B. cereus*; S. a - *S. aureus*; S.f - *Streptococcus faecalis*; E. a - *E. aerogenes*; E. c - *E. coli*; P. a - *P. aeruginosa*; S. m - *Serratia marcescens*

TABLE 5 Minimum bactericidal concentration towards *Bacillus cereus*

Chitosan	MBC values (mg/ml)
CTVB	5.00
CAA1	1.25
CAA2	2.50
CFA1	5.00
CHC11	0.625

for *P. aeruginosa*, only commercial crustacean chitosans were able to inhibit bacterial growth at all concentrations except for 0.625mg/ml which was the lowest concentration (Results not shown). *P. aeruginosa* is one of the more resistant bacteria towards most membrane active antibacterial agent. This is attributed to the difference in its polysaccharide makeup as well as the presence of hydroxy acids in lipid when compared to other enterobacteriaceae (Brown 1971).

The lowest MIC value obtained for Gram positive bacteria were 0.156mg/ml and 0.3125mg/ml whereas the lowest MIC value for Gram negative bacteria were 1.25mg/ml and 2.5mg/ml. In the MIC test, CAA1 gave an MIC value of 0.156 mg/ml for the Gram positive bacteria, *S. aureus* and *B. cereus* (Figure 1) whereas CAA2 yielded the best inhibitory effect towards Gram negative bacteria with an MIC value of 2.5mg/ml for *E. aerogenes* and *P. aeruginosa* (Figure 2). CAA2 has a higher MW (2.757×10^5 Da) and DD (86.15%) compared to other fungal chitosans such as CAA1

(82.56%, 2.370×10^5 Da). Due to its relatively higher molecular weight, CAA2 may cause a greater destabilization effect on the Gram negative bacterial cell that eventually led to bacterial growth inhibition (Helander 2001; Park et al. 2004). In addition, its high DD may also contribute to the change in the permeability of the plasmalemma thus leading to bacterial growth inhibition (Gagne 1993). Therefore, it can be postulated that higher degree of deacetylation and higher molecular weight of chitosan can better inhibit Gram negative bacteria (Helander et al 2001) as compared to the lower values for Gram positive bacteria (Table 1, Table 4, Figure 2). The MIC values given by CAA1 were comparable to that of the crustacean chitosan except for *E. coli* and *P. aeruginosa*. The crustacean chitosan CLMW and CS gave an MIC value of 0.078mg/ml for *S. aureus*. The MIC results also indicated that the effectiveness of the antimicrobial activity of chitosan is dependent on its physicochemical attributes as well as the morphology of the test bacteria (Table 4).

The difference in the concentration which causes inhibition of bacterial growth for the disc diffusion test and the determination of the MIC value may lie in chitosan's ability to chelate ions, essential nutrients and trace elements from the growth media. Chelation of these nutrients deprive bacteria of essential matters to sustain growth (Park et al. 2004). Chelation also more readily occurs in liquid matrix (MHB) as compared to solid matrix (MHA).

In addition, this study also found that fungal chitosan produced from various treatments have antibactericidal effects towards *B. cereus* at different concentrations (Table 5). This might occur due to the significantly lower average molecular weight of the fungal chitosan as compared to the crustacean chitosan which enabled it to penetrate *B. cereus* to cause further disruption in the bacterial cell which eventually led to bacterial cell death (Rose 1980). In addition, it was observed that the MBC values differ according to chitosan sample used with CHCl giving the lowest MBC value of 0.625mg/ml (Table 5). The possible explanation to this phenomenon is that CHCl is more readily protonated as compared to other chitosan samples. This creates a more acidic environment in the growth medium, thus increasing its ability to bind to the outer membrane of Gram negative bacteria (Helander et al. 2001; Xie et al. 2002) causing a change in the morphology of the plasmalemma thereby eventually leading to cell death. The crustacean chitosan used in this study did not exhibit antibactericidal effect towards *B. cereus*. It is possible that the crustacean chitosan were unable to cause further bacterial damage due to their high average molecular weight (2.216×10^6 Da to 8.099×10^6).

4. Conclusion

Among all fungal chitosan samples, CAA1 (82.56%, 2.370×10^5 Da) was found to give the best overall results for both disc diffusion test and the determination of the MIC value when tested against Gram positive bacteria meanwhile CAA2 rendered the best results in the MIC determination when tested against Gram negative bacteria. The combination of high degrees of deacetylation and high molecular weight might not necessarily yield better bacterial growth inhibition as its action also depends on its interaction with the

bacteria, and the nature of the target organism. This study also discovered that a specific range of degree of deacetylation for effective antimicrobial activities exists. However the specific range of DD is yet to be determined as it might differ according to the test organism employed.

5. Acknowledgement

The authors would like to thank the Ministry of Science, Technology and Innovation for the National Science Fellowship awarded to Dawn Carmel Paul and for IRPA Grant awarded to Dr. Kalaivani Nadarajah and Prof. Dr. Abdul Jalil Abdul Kader.

6. References

- Arcidiacono, S. & Kaplan, D.L. (1992). Molecular Weight Distribution of Chitosan Isolated from *Mucor rouxii* under Different Culture and Processing Conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 281-286.
- Brown, M.R.W. (1971). Inhibition and destruction of *P. aeruginosa*. In: *Inhibition and destruction of the microbial cell*, Hugo, W.B. (Ed), Academic Press, London.
- Dagry, M.K., Reddy, B., Benhamou, N. & Arul, J. (2000). Antimicrobial action of chitosan on postharvest storage bacteria, *Abstrat, IFT Annual Meeting*, 65C-24
- Gagne, N. (1993). *Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid*. MSc Thesis, McGill University, Montreal.
- Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235-244
- Jeon, Y.J., Park, P.J., & Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effects of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate Polymers*, 44, 71-76.
- Jiang, Y., Bi, Y., Wang, Z. & Jiang, J. (1996). *In-vitro* antibacterial properties of chitosan, *Chinese Journal of Antibiotics*, 21, 54-56.
- Muzzarelli, R.A.A. & Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry, *Carbohydrate Polymers* 5:461-472.
- Park, P.J., J.Y. Je, H.G. Byun, S.H. Moon & Kim, S.K. (2004). Antimicrobial activity of heterochitosans and their oligosaccharides with different

- molecular weights, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 317-323.
- Rane, K.D. & Hoover, D.G. (1993). An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extracted from fungi, *Process Biochemistry* 28:115-118.
- Rege, P.R. and Block, L. H. (1999). Chitosan processing: Influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties, *Carbohydrate Research*, 321, 235-245.
- Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry. The Macmillan Press Ltd, London.
- Roller, S. & Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice, *International Journal of Food Microbiology* 47, 67-77.
- Rose, A.H. (1980). *Chemical Microbiology: An introduction to microbial physiology*, Butterworths, London.
- Sudarshan, N.R., D.G. Hoover & D. Knorr. (1992). Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnology*, 6, 257-272.
- White, S.A., Farina, P.R. and Fulton, I. (1979). Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*, *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 323-328.
- Xie, W.M., Xu, P.X., Wang, W. & Liu, Q. (2002). Preparation and antibacterial activity of water-soluble chitosan derivative, *Carbohydrate Polymers*, 50, 35-40.

Perbandingan Produk Bakeri Dibakar Terus Dengan Produk Bakeri Sejukbeku Serta Dibakar

Abdul Salam Babji, Norrakiah Abdullah Sani dan Khairul Faizal Pa'ee

Program Sains Makanan, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor, Malaysia.
E.mail: daging@pkriscc.cc.ukm.my

Abstrak

Dalam kajian ini, produk bakeri sejukbeku dibandingkan dengan produk bakeri dibakar terus pada hari yang sama ia dikeluarkan. Dua produk ini dibezakan dari segi prosesnya iaitu proses konvensional di mana produk bakeri ini dibakar terus selepas doh dinaikkan dan proses penyejukan sebelum dibakar. Objektif kajian ini adalah untuk membuktikan bahawa produk bakeri sejukbeku serta dibakar adalah lebih baik kualitinya berbanding produk bakeri dibakar terus. Produk seperti Butter Gipfel Crescent (preproven) dan Farmers Bread (prabakar) telah digunakan sebagai sampel kajian. Berikutan itu, penentuan parameter seperti kehilangan berat produk, peratusan kelembapan, analisis tekstur dan peratusan kerak dan isi roti ditentukan. Kehilangan berat Butter Gipfel Crescent, selepas dibakar terus adalah lebih tinggi berbanding perlakuan sejukbeku serta dibakar ($P < 0.05$). Bagi Farmers Bread, kehilangan berat bagi perlakuan sejukbeku serta dibakar adalah lebih tinggi berbanding dibakar terus ($P < 0.05$). Kandungan kelembapan sepanjang tempoh 24jam pengeringan bagi kedua-dua sampel untuk perlakuan sejukbeku serta dibakar adalah lebih tinggi berbanding dibakar terus ($P < 0.05$). Bagi analisis tekstur, kedua-dua produk yang disejukbeku serta dibakar mempunyai tahap penembusan yang lebih tinggi oleh penetrometer berbanding dibakar terus. Bagi peratusan kerak dan isi, kedua-dua sampel yang disejukbeku dan dibakar mempunyai peratusan kerak yang lebih tinggi berbanding dibakar terus ($P < 0.05$). Berdasarkan penilaian sensori secara keseluruhan, pengguna lebih menggemari produk Butter Gipfel Crescent yang disejukbeku serta dibakar dan bagi Farmers Bread pula, pengguna lebih menggemari sampel yang dibakar terus daripada disejukbeku serta dibakar. Kesimpulannya, produk bakeri sejukbeku serta dibakar adalah lebih baik kualitinya berbanding dibakar terus kerana kebolehannya mengekalkan peratusan kelembapan dan justeru memberi kesan yang baik kepada tekstur dan penerimaan pengguna.

Kata Kunci: Makanan sejukbeku, produk bakeri sejukbeku, produk bakeri dibakar terus.

1. Pengenalan

Pembuatan roti adalah teknologi tertua dalam sejarah manusia. Masyarakat Babylon, Yunani dan Rom menggunakan roti sebagai diet harian mereka berdekad lalu (Matz, 1995). Berikutan itu, teknologi pembuatan roti berevolusi dalam pelbagai pendekatan. Bahan dan ingredien baru diperkenalkan. Kebelakangan ini, pengguna dan juga begitu mengambil berat mengenai aspek keselamatan dan juga mutu sesuatu makanan. Dalam industri bakeri, permintaan semakin meningkat sejak penghasilan produk baru yang diperkenalkan dengan menggunakan beberapa teknologi

moden. Beberapa tahun lalu, industri bakeri telah menggunakan teknologi sejukbeku dalam usaha meningkatkan keyakinan pengguna dengan produk bakeri yang ditingkatkan jangkahayatnya. Penghasilan bakeri sejukbeku mempunyai peranannya tersendiri berdasarkan penghasilannya yang singkat, harga yang berpatutan dan mutu sensori yang seakan produk bakeri segar. Walau bagaimanapun, penggunaan teknologi sejukbeku mempunyai masalah yang perlu dititikberatkan dalam menjamin kualiti sesuatu roti (Giannou *et al.*, 2003). Kajian ini dijalankan bagi menentukan tahap penerimaan produk bakeri sejukbeku.

Produk bakeri yang dikaji adalah jenis *preproven* (*Butter Gipfel Crescent*) dan jenis prabakar (*Farmers Bread*). Objektif kajian ini juga adalah untuk membuktikan bahawa produk bakeri sejukbeku serta dibakar adalah lebih baik kualitinya berbanding produk bakeri dibakar terus.

2. Bahan dan Kaedah

Sampel kajian disediakan oleh Hiestand Malaysia Sdn. Bhd. dimana terdapat tiga jenis aras kemudahan iaitu *preproven*, prabakar dan konvensional (segar). Sampel kajian ialah produk bakeri *Butter Gipfel Crescent* dan *Farmers Bread*. Parameter yang dikaji ialah kehilangan berat selepas pembakaran, penentuan kelembapan dengan spektroskopi FT-NIR dan oven, analisis tekstur menggunakan penetrometer, penentuan peratusan kerak dan isi serta penilaian sensori. Terdapat dua ujian penilaian sensori iaitu ujian deskriptif yang menggunakan panel terlatih dari pelajar Sains Makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) dan Hiestand Malaysia Sdn. Bhd. Manakala, ujian hedonik menggunakan

panel pengguna di UKM.

3. Keputusan Kajian

Bagi penentuan kehilangan berat, didapati terdapat perbezaan bererti ($P < 0.05$) bagi kedua-dua produk untuk perlakuan sejukbeku serta dibakar dan dibakar terus (Jadual 1). Rawatan suhu sejukbeku pada -22°C membolehkan produk bakeri mengekalkan kelembapan berbanding produk bakeri dibakar terus. Rawatan sejukbeku secara mendadak dapat meningkatkan ketebalan doh dan seterusnya mengurangkan kehilangan kelembapan semasa penyimpanan (Marston 1978).

Analisis kandungan kelembapan dengan menggunakan spektrokopi FT-NIR dan kaedah oven menunjukkan terdapat perbezaan bererti ($P < 0.05$) bagi kedua-dua jenis produk (Jadual 2 dan 3). Peratusan kelembapan bagi perlakuan sejukbeku serta dibakar adalah lebih tinggi berbanding dengan dibakar terus. Produk bakeri sejukbeku serta dibakar mempunyai kerak roti yang kuat dimana ia meningkat keupayaan isi roti untuk menyimpan air. Oleh

Jadual 1: Keputusan Penentuan Kehilangan Berat Produk Bakeri

Produk bakeri	Kehilangan berat (g)	
	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus
<i>Butter Gipfel Crescent</i>	6.60 ± 1.03^a	9.00 ± 1.05^b
<i>Farmers Bread</i>	46.67 ± 7.26^a	26.33 ± 7.51^b

Nilai min pada baris yang sama dengan superskrip yang berbeza menunjukkan perbezaan yang bererti ($P < 0.05$)

Jadual 2: Nilai Peratusan Kandungan Kelembapan Menggunakan Spektroskopi FT-NIR

Produk bakeri	Peratusan kandungan kelembapan (%)	
	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus
<i>Butter Gipfel Crescent</i>	25.13 ± 0.57^a	16.93 ± 0.49^b
<i>Farmers Bread</i>	38.23 ± 0.58^a	23.19 ± 1.17^b

Nilai min pada baris yang sama dengan superskrip yang berbeza menunjukkan perbezaan yang bererti ($P < 0.05$)

Jadual 3: Nilai Peratusan Kandungan Kelembapan Menggunakan Kaedah Oven (AOAC 1984)

Produk bakeri	Peratusan kandungan air (%)	
	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus
<i>Butter Gipfel Crescent</i>	19.92 ± 0.81^a	17.68 ± 0.60^b
<i>Farmers Bread</i>	43.11 ± 3.00^a	32.16 ± 3.05^b

Nilai min pada baris yang sama dengan superskrip yang berbeza menunjukkan perbezaan yang bererti ($P < 0.05$)

Jadual 4: Nilai Analisis Tekstur Dengan Menggunakan Penetrometer

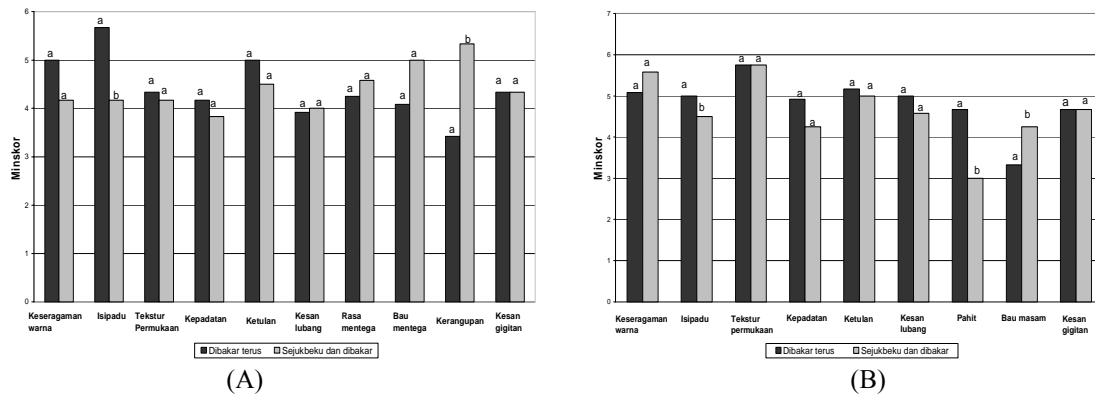
Produk bakeri	Nilai tekstur ths m/m	
	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus
<i>Butter Gipfel Crescent</i>	219.2 ± 75.5^a	115.0 ± 39.3^b
<i>Farmers Bread</i>	290.0 ± 39.4^a	267.2 ± 43.2^a

Nilai min pada baris yang sama dengan superskrip yang berbeza menunjukkan perbezaan yang bererti ($P < 0.05$)

Jadual 5: Keputusan Penentuan Kerak dan Isi Produk Bakeri

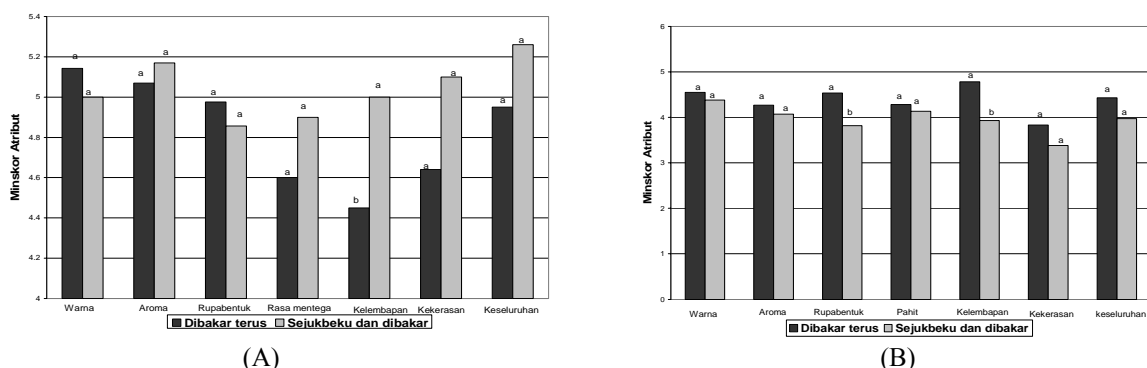
Produk bakeri	Peratusan kerak (%)		Peratusan isi(%)	
	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus	Sejukbeku serta dibakar	Dibakar terus
<i>Butter Gipfel Crescent</i>	54.33 ^a	49.04 ^b	45.67 ^b	50.96 ^a
<i>Farmers Bread</i>	38.84 ^a	33.00 ^b	61.16 ^b	67.00 ^a

Nilai min pada baris yang sama dengan superskrip yang berbeza menunjukkan perbezaan yang bererti (P<0.05)



Rajah 1: Min Skor Bagi Penilaian Sensori (Ujian Deskriptif) Bagi Produk *Butter Gipfel Crescent* (A) dan *Farmers Bread* (B)

^{a-b}: Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan bererti (P<0.05)



Rajah 2: Min Skor Bagi Penilaian Sensori (Ujian Hedonik) Bagi Produk *Butter Gipfel Crescent* (A) dan *Farmers Bread* (B)

^{a-b}: Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan bererti (P<0.05)

itu, kelembapan di dalam isi roti dapat dikekalkan untuk meningkatkan kualiti produk bakeri sejukbeku.

Analisis tekstur menunjukkan perbezaan bererti (P<0.05) bagi produk *Butter Gipfel Crescent* (Jadual 4). Ini menunjukkan bahawa kelembapan yang tinggi dalam produk bakeri sejukbeku akan memberi kesan tekstur yang lembut.

Terdapat perbezaan bererti (P<0.05) dalam penentuan peratusan kerak dan isi bagi kedua-dua produk (Jadual 5). Peratusan kerak yang

tinggi memberikan kelebihan kepada produk bakeri tersebut untuk mengurangkan kehilangan kelembapan. Peratusan kerak yang tinggi bagi *Farmers Bread* menunjukkan kesan pembakaran dua kali bagi jenis prabakar. Kehilangan kelembapan dapat diminimalkan kerana kurang air dapat meresap ke permukaan produk bakeri.

Atribut yang dinilai dalam ujian deskriptif ialah keseragaman warna, isipadu roti, tektur permukaan, kepadatan, ketulan, kesan lubang, rasa mentega, bau mentega, keranggupan dan kesan gigitan (Rajah 1). Bagi produk *Butter*

Gipfel Crescent, terdapat perbezaan bererti bagi atribut isipadu dan keranggapan ($P < 0.05$). Bagi produk *Farmers Bread* pula, terdapat perbezaan bererti bagi atribut isipadu, kepahitan dan kemasaman bagi kedua-dua perlakuan ($P < 0.05$).

Dalam ujian hedonik, atribut yang dinilai ialah keseragaman warna, aroma, rupabentuk, rasa mentega, pahit, kelembapan, kekerasan dan penerimaan keseluruhan (Rajah 2). Bagi produk *Butter Gipfel Crescent* dan *Farmers Bread*, panel dapat membezakan atribut kelembapan secara bererti ($P < 0.05$) bagi kedua-dua perlakuan. Secara keseluruhan ujian deskriptif menunjukkan bahawa produk *Butter Gipfel Crescent* sejukbeku serta dibakar paling digemari berbanding dibakar terus tetapi bagi produk *Farmers Bread*, perlakuan dibakar terus adalah lebih digemari.

4. Kesimpulan

Produk bakeri sejukbeku serta dibakar mempunyai kandungan kelembapan yang lebih tinggi berbanding produk bakeri segar disebabkan penghasilan kerak roti yang tebal bagi produk bakeri sejuk beku serta dibakar yang dapat meminimalkan kehilangan air.

Justeru itu, ia memberikan tekstur yang lembut kepada produk bakeri sejukbeku. Ujian sensori mendapati produk *Butter Gipfel Crescent* sejukbeku serta dibakar serta *Farmers Bread* dibakar terus paling digemari oleh ahli panel pengguna.

5. Penghargaan

Penghargaan diberikan kepada Hiestand Malaysian Sdn.Bhd. kerana telah memberikan peluang menjalankan kajian ini serta membantu menyediakan sampel kajian.

6. Rujukan

- AOAC (1984). Official Methods of Analysis (11th Ed.). Associate of Official Agricultural Chemist, Washington D.C.
- Giannou, V., Kessoglou, V., Tzia, C. (2003). Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *J. Food Sc.* **14**: 99-108.
- Matz, S.A (1995). *Bakery technology and engineering*. Ed. Ke-2. Jil. 1. The AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Marston, P.E (1978). *Bakers Digest*. Ed. 2. Jil.52.: 18.

Dua Senyawa Oligomer Reaveratrol Dari Kulit Batang *Shorea Parvifolia* Dyer. (DIPTEROCARPACEAE)

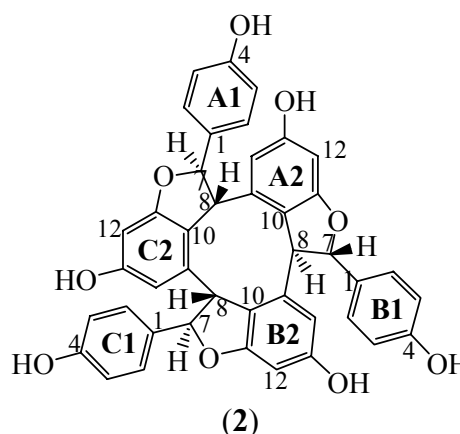
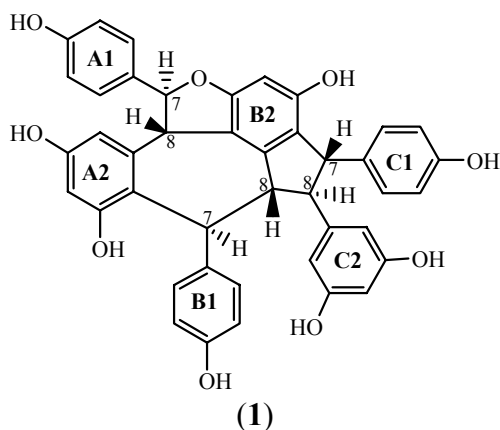
Kholifatu Rosyidah,¹ Yana M. Syah,¹ Sjamsul A. Achmad,¹ Euis H. Hakim,¹ Lukman Makmur,¹ Lia D. Juliawati,¹ Laily B. Din,² Jalifah Latip,² Ikram M. Said²

¹ Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia

² School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kabangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E. Malaysia

Abstrak

Dua trimer resveratrol, *davidiol A* (1) dan (+)-(α)-viniferin (2) telah diisolasi untuk pertama kalinya dari ekstrak aseton kulit batang *Shorea parvifolia* Dyer. Struktur kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi meliputi data spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR serta perbandingan dengan data sejenis dari senyawa yang sama yang telah dilaporkan.



Kata kunci: *davidiol A*, (+)-(α)-viniferin, oligomer resveratrol, *Shorea parvifolia* Dyer., Dipterocarpaceae.

1. Pendahuluan

Shorea terdiri dari 150 spesies, merupakan genus utama dari famili Dipterocarpaceae disamping *Hopea* (100 spesies) dan *Dipterocarpus* (70 spesies). Di Indonesia terdapat sekitar 79 spesies *Shorea*, 56 spesies tersebar di Kalimantan dan 27 spesies diantaranya merupakan tumbuhan endemik di Indonesia. Dipterocarpaceae dikenal sebagai

meranti, merawan, keruing, atau tengkawang. Masyarakat menggunakan tumbuhan ini terutama sebagai bahan bangunan. Selain itu, tumbuhan ini juga menghasilkan getah damar dan minyak tengkawang.^{1,2} *Shorea parvifolia* Dyer adalah salah satu tumbuhan Dipterocarpaceae yang tersebar luas di Kalimantan, Sumatera, Malaya, dan Thailand.³

Senyawa oligomer resveratrol banyak ditemukan dalam tumbuhan famili Dipterocarpaceae berupa monomer, dimer, trimer dan tetramer stilbenoid. Beberapa senyawa oligomer stilbenoid yang berhasil diisolasi menunjukkan aktivitas biologi yang penting seperti anti HIV⁴, anti inflamasi⁵, anti jamur⁶, anti bakteri⁷, sitotoksis sel dan antitumor⁸. Makalah ini akan melaporkan hasil penelitian khususnya mengenai senyawa oligomer stilbenoid dari ekstrak aseton kulit batang *S. parvifolia*. Struktur senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi serta dibandingkan dengan standar.

2. Percobaan

Umum. Spektrum UV ditentukan dengan spektrometer Varian Conc. 100, sedangkan spektrum IR diukur dengan spektrometer FTIR Perkin Elmer Spectrum One. Spektrum NMR ditentukan dengan JEOL AS400 yang beroperasi pada 400 MHz (¹H) dan 100 MHz (¹³C). Kromatografi Vakum Cair (KVC) dan Kromatografi Radial dilakukan dengan menggunakan silika gel G60 GF₂₅₄, sedangkan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikerjakan dengan plat aluminium berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ setebal 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan berkualitas teknis yang didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan kecuali CHCl₃.

Bahan Tumbuhan. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah kulit batang *S. parvifolia* yang dikumpulkan dari wilayah HPH PT Aya Yayang Indonesia Camp 63, Tanjung, Tabalong, Kalimantan Selatan pada bulan Juli 2004. Contoh tumbuhan telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI, Bogor, Indonesia, dan spesimen disimpan di Herbarium tersebut.

Ekstraksi dan Isolasi. Sebanyak 2,97 kg serbuk kulit batang *S. parvifolia* dimaserasi dengan aseton selama 24 jam. Maserasi diulang sebanyak tiga kali. Ekstrak aseton (200 gr) dipartisi dengan eter untuk mengendapkan tannin. Filtrat diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering (51,3 gr) yang relatif bebas tannin. Sebanyak 40 gr ekstrak kering difraksinasi dengan KVC menggunakan silika gel G60 GF₂₅₄ dengan eluen yang ditingkatkan kepolarannya (n-heksana-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH) menghasilkan 6 fraksi

gabungan. Fraksi D difraksinasi lebih lanjut menggunakan kromatografi radial (CHCl₃-MeOH) dan KVC (n-heksana-EtOAc) diperoleh 7 fraksi gabungan. Fraksi gabungan D6 difraksinasi lagi menggunakan kromatografi radial (CHCl₃-MeOH) dan kromatografi kolom tekan dengan eluen CH₂Cl₂-aseton 30% menghasilkan senyawa **1** sebanyak 28 mg. Fraksi gabungan D1 & C difraksinasi dengan kromatografi radial menghasilkan senyawa **2** sebanyak 380 mg.

Senyawa **1** berupa serbuk coklat, t.l. 203-205°C (terurai), $[\alpha]_D^{20}$ -213 (c=0,1 dalam MeOH). UV (MeOH) λ_{maks} 203, 226 (bh), 284 nm. UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} 207, 249 (bh), 289 nm. IR (KBr) ν_{maks} = 3391, 2920, 1613, 1512, 1455, 832 cm⁻¹. Data ¹H NMR (aseton-d₆) δ ppm dan ¹³C-NMR (aseton-d₆) δ ppm lihat pada Tabel 1.

Senyawa **2** berupa serbuk coklat muda, t.l. 229-231°C (terurai), $[\alpha]_D^{20}$ +61 (c=0,1 dalam MeOH). UV (MeOH) λ_{maks} 203, 228 (bh), 285, 296(bh) nm. UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} 206, 226, 251, 293 nm. IR (KBr) ν_{maks} = 3391,1615,1515,1441,831,764 cm⁻¹.

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa **1** berupa serbuk coklat, t.l. 203-205°C (terurai), $[\alpha]_D^{20}$ -213 (c=0,1 dalam MeOH). Spektrum UV (MeOH) senyawa **1** memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang 284 nm yang menunjukkan adanya kromofor fenol tersubstitusi dan mengalami pergeseran batokromik pada penambahan NaOH menjadi 289 nm. Spektrum IR senyawa **1** menunjukkan adanya pita serapan gugus hidroksil pada 3391 cm⁻¹, CH alifatik pada 2920 cm⁻¹, C=C aromatik pada 1613, 1512 dan 1455 cm⁻¹, dan gugus para substitusi fenil pada 832 cm⁻¹.

Spektrum ¹³C-NMR menunjukkan adanya 42 atom karbon, sembilan diantaranya karbon oksiaril pada δ 154,8 (C-13b), 155,8 (C-4a), 156,6 (C-4c), 156,9 (C-13a), 158,0 (C-11a), 158,2 (C-4b), 158,9 (C-11c), 158,9 (C-13c), dan 159,4 (C-11b) ppm yang merupakan karakteristik dari trimer resveratrol. Spektrum ¹H-NMR senyawa **1** menunjukkan adanya tiga pasang proton aromatik kopel-*orto* pada δ 7, 19 (2H, d, *J* 8,6 Hz, H-2a,6a) dan 6, 78 (2H, d, *J* 8,6 Hz, H-3a,5a); δ 7, 01 (2H, d, *J* 8,4 Hz, H-2b,6b) dan 6,58 (2H, d, *J* 8,4 Hz, H-3b,5b); δ

Tabel 1. Data ^1H dan ^{13}C -NMR senyawa **1**

No	δH (multiplisitas, J <i>dm</i> Hz)	δC
1a	-	134.3
2a,6a	7, 19 (d, 8,6)	128.1
3a,5a	6, 78 (d, 8,6)	116, 0
4a	-	155, 8
7a	6, 08 (d, 2,2)	85, 8
8a	4, 40 (s)	50.4
9a	-	147
10a	-	117.9
11a	-	158,0
12a	6, 40 (d, 2,2)	101, 3
13a	-	156,9
14a	6, 55 (d, 2,2)	103.9
16	-	137.4
2b,6b	7,01 (d, 8,4)	129.6
3b,5b	6, 58 (d, 8,4)	115, 3
4b	-	158,2
7b	5, 24 (s)	36,5
8b	4,19 (d, 11,7)	51.7
9b	-	143.2
10b	-	119
11b	-	159.4
12b	6, 02 (s)	95.9
13b	-	154, 8
14b	-	122, 2
1c	-	134, 2
2c,6c	6, 73 (d, 8,6)	129.8
3c,5c	6,61 (d, 8,6)	115, 5
4c	-	156.6
7c	4, 38 (d, 9,9)	56.1
8c	2, 95 (dd, 11,7; 9,9)	67.5
9c	-	144
10c	6, 42 (d, 2,2)	108.3
11c	-	158, 9
12c	6,17 (t, 2,2)	102
13c	-	158,9
14c	6,42 (d, 2,2)	108.3

6,73(2H, d, J 8,6 Hz, H-2c,6c) dan 6,61 (2H, d, J 8,6 Hz, H-3c,5c) ppm yang menunjukkan adanya tiga gugus 4-hidroksifenil. Data spektrum ^1H -NMR juga menunjukkan sinyal-sinyal untuk satu pasang proton aromatik kopel-*meta* pada δ 6,40 (1H, d, J 2,2 Hz, H-12a) dan 6,55 (1H, d, J 2,2 Hz, H-14a) yang sesuai untuk gugus 1,2,3,5-tetrasubstitusifenil, satu sinyal singlet aromatik pada δ 6,02 ppm untuk 1,2,3,5,6-pentasubstitusifenil, dan sinyal-sinyal proton aromatik dengan sistem

spin A_2X pada δ 6,42 (2H, d, J 2,2 Hz, H-10c,14c) dan 6,17 (1H, t, J 2,2 Hz, H-12c) untuk gugus 1,3,5-trisubstitusifenil. Berdasarkan data ^1H dan ^{13}C -NMR tersebut, senyawa **1** adalah trimer resveratrol davidiol A.

Perbandingan data ^1H dan ^{13}C -NMR senyawa **1** dengan davidiol A memperlihatkan kesesuaian pada nilai geseran kimianya. Selanjutnya konfirmasi struktur senyawa **1**

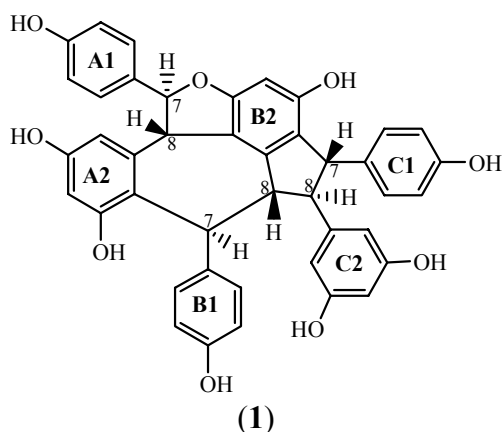
Tabel 2. Perbandingan data fisik antara senyawa 1 dan davidiol A standar

No	Data Fisik	senyawa 1	davidiol A <i>Shopora davidii</i> ⁹	davidiol A <i>Shorea guiso</i> ¹¹
1.	Wujud zat	serbuk coklat	Serbuk tak berwarna	Serbuk coklat
2.	Titik leleh	203-205°C (terurai)	-	202-204°C (terurai)
3.	$[\alpha]^{29/20}_D$	-213 (c=0,1, MeOH)	272 (c=0,18, MeOH)	-268 (c=0,1, MeOH)
4.	Spektrum IR (KBr) ν_{maks} (cm ⁻¹)	3391,1613,1512, 1455,1241,1140, 1004,832	-	3348,1613,1512, 1453,1242,1140, 1003,832
5.	Spektrum UV λ_{maks} (MeOH) nm	203, 226bh, 284	219, 285	204, 227bh, 284

Tabel 3. perbandingan data fisik antara senyawa 2 dan (+)-(α)-viniferin standar

No	Data Fisik	Senyawa 2	(+)-(α)-viniferin <i>Caragana chamlagu</i> ⁵	(+)-(α)-viniferin <i>Hopea bancana</i> ¹³
1.	Wujud zat	serbuk coklat muda	Prisma tak berwarna	Serbuk kuning muda
2.	Titik leleh	229-231°C	231-233 °C	225-227 °C
3.	$[\alpha]^{20}_D$	+ 61 ⁰ (c=0,1 MeOH)	+ 50,7 ⁰ (c=1,02 EtOH)	+34 (c=0,1 MeOH)
4.	Spektrum IR (KBr) ν_{maks} (cm ⁻¹)	3391,1615,1515, 1441,831,764	3400,1613,1597, 1514,829,805, 774,763	3401,1615,1599, 1516,833,807, 768,760
5.	Spektrum UV λ_{maks} (MeOH) nm	203,226bh,285	210,228bh,278	207,228bh,278

didasarkan pada perbandingan data fisik dan spektroskopi UV dan IR dari senyawa davidiol A dan senyawa 1 seperti terlihat pada Tabel 2. Dengan membandingkan data-data di atas maka dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah senyawa davidiol A yang diisolasi pertama kalinya dari spesies *S. parvifolia*. Senyawa davidiol A pertama kali ditemukan pada tumbuhan *Shopora davidii*⁹ dan sudah pernah diisolasi dari *Shorea hemsleyana*¹⁰ dan *Shorea guiso*¹¹. Senyawa davidiol A dilaporkan menunjukkan aktivitas antitumor.¹²

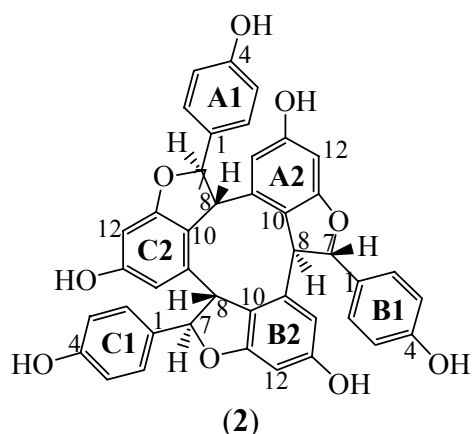


Spektrum UV dan IR senyawa 2 tidak berbeda secara signifikan dengan spectrum yang sama dari senyawa 1. Hasil perbandingan dengan data base IR memberikan korelasi 97% dengan senyawa (+)-(α)-viniferin. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) senyawa 2 dan senyawa standar menunjukkan harga Rf yang sama terhadap tiga sistem eluen yang berbeda. Berdasarkan hal ini maka penentuan struktur senyawa 2 selanjutnya dengan membandingkan data fisik dan spektroskopi UV dan IR kedua senyawa tersebut seperti terlihat pada tabel 3.

Dari hasil perbandingan data senyawa 2 dan standar, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa 2 adalah senyawa (+)-(α)-viniferin yang diisolasi pertama kalinya dari spesies *S. parvifolia*. Senyawa (+)-(α)-viniferin sebelumnya telah diisolasi dari beberapa tumbuhan seperti *Caragana chamlagu*⁵, *Shorea hemsleyana*¹⁰, *S. parvistipulata*¹³ dan *Hopea bancana*¹³.

Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa (+)-(α)-viniferin memperlihatkan aktivitas anti inflamasi⁵ dan

anti fungi.⁶ Uji toksisitas menggunakan benur udang *Artemia salina* terhadap (+)- α -viniferin juga memperlihatkan toksisitas yang tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 48 $\mu\text{g/mL}$.¹³ Sedangkan senyawa enantiomernya yaitu (-)- α -viniferin memperlihatkan LC_{50} sebesar 63,45 $\mu\text{g/mL}$ terhadap benur udang *A. salina* dan IC_{50} sebesar 1,40 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel *murine leukemia* P388.¹⁴ Senyawa α -viniferin merupakan komponen utama pada *S. parvifolia* dan pada genus *Shorea* pada umumnya.



4. Kesimpulan

Berdasarkan uraian di atas, dapat disimpulkan bahwa dua senyawa trimer resveratrol yaitu davidiol A (1) dan (+)- α -viniferin (2) telah berhasil diisolasi dari kulit batang *S. parvifolia*. Struktur molekul kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi meliputi data spektroskopi UV, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ serta perbandingan dengan data sejenis dari senyawa yang sama yang telah dilaporkan.

5. Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan beasiswa BPPs untuk melanjutkan program magister, kepada HPH PT Aya Yayang Indonesia Camp 63, Tanjung, Tabalong, Kalimantan Selatan yang telah memberi sampel untuk penelitian ini, serta kepada Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Botani, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI, Bogor Indonesia, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan

6. Daftar pustaka

1. Cronquist, A. 1981, *An integrated system of classification of flowering plant*, Columbia University Press, New York, 317-318
2. Heyne, K., 1987, "*Tumbuhan berguna Indonesia*", Badan Litbang Kehutanan Jakarta, 1390-1443
3. Steenis, V.J., 1979, "*Flora Malesiana*", LIPI, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Boston, 546-547.
4. Dai, J.R.; Hallock, Y.F.; Cardellina, J.H.; Boyd, M.R. "HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*", *J. Nat. Prod.*, 1998, 61, 351-353
5. Kitanaka, S.; Ikezawa, T.; Yasukawa, K.; Yamanauchi, S.; Takido, M.; Sung, H.K.; Kim, I.H., "(+)- α -viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana Chamlagu* root", *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 432-435
6. Pryce, R.J., Langcake, P. " α -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevine", *Phytochemistry*, 1977, 16, 1452-1454
7. Sultanbawa, M.U.S.; Surendrakumar.S.; Bladon, P. "Disticol an antibacterial polyphenol from *Shorea distica*", *Phytochemistry*, 1987, 26, 799-801
8. Ohyama, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Iinuma, M.; Bastow, K.F.; Lee, K.H. "Antitumor agents 200.1 cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 3057-3060
9. Tanaka, T.; Ito, T.; Iinuma, M.; Y.; Ohyama, M.; Ichise, M.; Tateishi, Y., "Stilbene oligomers in root of *Shorea davidii*", *Phytochemistry*, 2000, 53, 1009-1014
10. Ito, T.; Tanaka, T.; Ido, Y.; Nakaya, K.; Iinuma, M.; Y.; Riswan, S., "Stilbenoids isolated from stem bark of *Shorea hemsleyana*", *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, 48, 1001-1005
11. Muharini, R.; Hakim, E.H.; Achmad, S.A.; Aimi, N.; Makmur, L.; Syah, Y.M.; Juliawaty, L.D.; Kitajima, M.; Takayama, H., "Davidiol A, a stilbenoid derivative from tree bark of *Shorea guiso* Blume", *Bull. Soc. Nat. Prod. (Indonesia)*, 2002, 2, 37-40
12. Nozaki, H.; Hayasi, H.; Hayasi, K.; Ohira, S.; Ikeda, S.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Ohyama, M., In Symposium Papers of 39th

Kholifatu Rosyidah, Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Euis H. Hakim, Lukman Makmur, Lia D. Juliawati, Laily Bin Din, Jalifah Latip, Ikram M. Said

- Symposium on the Chemistry of Natural Products, Sapporo, 1997, 571
13. Tukiran, 2003, "*Senyawa mikromolekul dari beberapa tumbuhan meranti (Shorea) Indonesia*", Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung, Indonesia, 92-95
 14. Aminah, N.S., 2003, "*Fitokimia beberapa spesies Shorea (Dipterocarpaceae) Hutan Tropika Kalimantan*", Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung, Indonesia, 126-127.

Studi Struktur Fungsi Domain Polimerase DNA Pol I ITB

L. Ambarsari⁽¹⁾, F. Madayanti⁽¹⁾, M.R. Moeis⁽²⁾ dan Akhmaloka⁽¹⁾

¹⁾ Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha No. 10 Bandung 40132, Indonesia
E-mail: loka@chem.itb.ac.id

³⁾ Departemen Biologi FMIPA, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha No. 10 Bandung 40132, Indonesia
E-mail: Maelita@bi.itb.ac.id

Abstrak

DNA polimerase merupakan enzim multifungsi yang terdiri dari 3 domain yaitu: eksonuklease 5'-3', eksonuklease 3'-5', dan polimerase 5'-3'. Dalam penelitian ini telah dilakukan studi struktur fungsi domain polimerase DNA Pol I ITB melalui mutasi terarah (site directed-mutagenesis). Hasil peninjauan urutan asam amino yang dibandingkan dengan asam amino dari beberapa bakteri diperoleh 6 daerah lestari (conserved). Hasil analisis homologi menunjukkan bahwa DNA Pol I ITB mempunyai kemiripan yang tinggi dengan *B. caldotenax* yaitu 99%. Sisi aktif enzim terletak pada daerah lestari 3 dan 5 (motif A dan C) yang terletak pada subdomain palm. Sisi aktif enzim dicirikan dengan 3 residu asam amino yang rantai sampingnya mengandung gugus karboksilat, yaitu: Asp⁶⁵³, Asp⁸³⁰ dan Glu⁸³¹. Studi mutagenesis dilakukan terhadap residu asam amino lestari yaitu Asp⁸⁰² (yang terletak pada daerah lestari 6) dan Glu⁸³¹ (yang terletak pada daerah lestari 5/motif C). Mutasi dilakukan dengan metode PCR megaprimer. Mutan D802N dan E831Q telah berhasil dikonstruksi dan diekspresi secara heterolog di *E. coli*.

Kata Kunci: daerah lestari (conserved), ekspresi heterolog, mutasi terarah (site directed-mutagenesis), PCR megaprimer, studi struktur fungsi

1. Pendahuluan

DNA polimerase merupakan komponen yang sangat penting bagi seluruh organisme hidup, karena mempunyai peranan di dalam proses replikasi dan perbaikan kesalahan DNA (*repairing*). Fungsi utama aktivitas enzim tersebut adalah mengkatalisis penambahan unit mononukleotida dari deoksinukleosida 5' trifosfat (dNTP) pada ujung 3' OH dari suatu untai primer, dan dalam reaksi tersebut diperlukan satu untai DNA yang digunakan sebagai cetakan (*template*) yang mengarahkan enzim dalam menyeleksi nukleotida yang masuk. Enzim ini dicirikan sebagai enzim multifungsi yang terdiri atas tiga domain dan setiap domain mempunyai aktivitas katalitik, yaitu: aktivitas polimerase 5' → 3', aktivitas eksonuklease 3' → 5', dan aktivitas eksonuklease 5' → 3'. Aktivitas polimerase

berfungsi dalam reaksi polimerisasi DNA dari arah 5' → 3', aktivitas eksonuklease 3' → 5' berfungsi dalam proses *proofreading* yaitu memperbaiki ketepatan kopi DNA terhadap templatnya, dan aktivitas eksonuklease 5' → 3' berfungsi dalam mendegradasi RNA primer setelah proses pemanjangan dan translasi nick DNA (Li *et al.*, 1998; Joyce dan Steitz, 1994).

Struktur kristal DNA polimerase seperti *Taq* Pol I, *E. coli* Pol I (*KF*), *Bacillus* polimerase dan T7 DNA polimerase telah ditentukan (Patel & Loeb, 2000). Struktur kristal tersebut (domain polimerase), secara menyeluruh mempunyai *folding* yang mirip yaitu menyerupai tangan kanan yang terdiri atas tiga subdomain, yaitu: subdomain *palm*, yang berperan di dalam mengkatalisis reaksi pemindahan gugus fosfat dan di dalam reaksi

katalisisnya diperlukan 2 ion logam divalen (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}). Subdomain *fingers*, berperan di dalam interaksi dengan dNTP dan templat, sedangkan subdomain *thumb* mempunyai peranan di dalam prosesivitas (Li *et al.*, 1998; Patel *et al.* 2001). Sisi aktif enzim DNA polimerase terletak pada subdomain *palm* yang tersusun dari 3 residu asam amino yang mempunyai gugus karboksilat (Asp pada motif A serta Asp dan Glu pada motif C) (Patel *et al.*, 2001; Kiefer *et al.*, 1997; Joyce dan Steitz, 1994).

DNA polimerase digunakan di dalam teknik biologi molekular seperti dalam penentuan urutan nukleotida DNA (*DNA sequencing*) dan PCR (*polymerase chain reaction*) (Blondal *et al.*, 2001). Lebih dari 50 gen DNA polimerase telah diklon dan ditentukan urutan nukleotidanya (Uemori *et al.*, 1995). Beberapa dari DNA polimerase tersebut saat ini digunakan di bidang bioteknologi, terutama untuk proses PCR. Karena dalam setiap siklus PCR diperlukan termostabilitas enzim yang tinggi, maka DNA polimerase termostabil menjadi komponen yang sangat penting (Choi *et al.*, 1999; Adam dan Kelly, 1998).

Beberapa bakteri termofilik telah diisolasi dari sumber air panas Cimanggu dengan kondisi suhu $80^{\circ}C$ dan pH 7. Hasil identifikasi salah satu isolat dengan analisis 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri tersebut dikarakterisasi sebagai *Bacillus thermoleovorans* (Akhmaloka *et al.*, 2000b). Gen penyandi DNA polimerase dari isolat Cimanggu tersebut telah diklon ke dalam vektor ekspresi pTrxFus dan plasmid rekombinannya disebut pITB-9A. Plasmid tersebut diekspresikan dengan metode ekspresi gen secara heterolog di *E.coli* (Pramono H, 2004). Di dalam tulisan ini akan dilakukan kajian struktur-fungsi domain polimerase DNA Pol I ITB. Untuk kajian tersebut tahap awal penelitian dilakukan studi homologi untuk memperoleh residu asam amino lestari yang potensial untuk dimutasi. Tahap selanjutnya adalah mutasi terarah (*site directed-mutagenesis*) dengan mutasi tunggal untuk mengetahui fungsi dari residu asam amino tersebut. Mutasi dilakukan dengan metode PCR megaprimer. Adapun strategi untuk mendapatkan gen mutan adalah dengan merancang satu primer mutan serta satu pasang primer yang mengandung enzim restriksi dengan

sisi pemotongan *KpnI* dan *BamHI*. Untuk memastikan bahwa gen DNA polimerase telah termutasi, maka dilakukan karakterisasi dengan melakukan analisis restriksi terhadap gen mutan dan dilanjutkan dengan penentuan urutan nukleotida. Gen mutan yang telah diklon ke dalam vektor ekspresi digunakan untuk mentransformasi sel *E.coli* GI724, dan overekspresinya dianalisis dengan elektroforesis *SDS-PAGE*.

2. Percobaan

Peremajaan *E.coli*

E.coli GI724 yang membawa gen DNA Pol I mutan digoreskan dalam medium RMG-A (1 X M9 salts; 2% *casamino acid*; 0,5% glukosa; 1 mM $MgCl_2$; 100 $\mu g/ml$ ampicilin; dan 1,5% *bacto-agar*) langsung dari stok gliserol, kemudian diinkubasi pada temperatur $30^{\circ}C$ selama 12-16 jam.

Studi Homologi dan identifikasi residu asam amino lestari

Untuk mengetahui homologi (tingkat keidentikan) urutan basa dan residu asam amino lestari (motif) dapat dilakukan dengan membandingkan tingkat kesesuaian urutan nukleotida maupun tingkat kesesuaian urutan asam-asam amino yang terdapat di *GenBank*. Dalam penelitian ini digunakan program *Predictprotein* pada situs internet http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/submit_def.html.

Site directed-mutagenesis dengan PCR megaprimer

Mutasi dilakukan pada gen DNA Pol I yang telah di klon ke dalam vektor ekspresi pTrxFus (plasmid rekombinan pITB-9A) dengan menggunakan metode PCR megaprimer (Sambrook dan Russell, 2001; Barik, 1997). Primer untuk *site directed-mutagenesis* terdiri atas:

FPK: 5'-GGTACCAATGAAAAAAGCTTGTTTTAATC-3'

RPB: 5'-GGATCCTTTATGTGCGGTCATACC-3'

FM-802n: 5'-CAAGGGAGCGCCGCTAACATTATT-3'

FM-831q: 5'-ACAGGTGCATGACCAGCTCATTTTGG-3'

Primer FPK dan RPB dirancang dengan sisi pemotongan *KpnI* dan *BamHI* agar dapat disisipkan ke dalam vektor ekspresi pTrxFus. Sedangkan primer mutan Fm-802n dan FM-831q dirancang sesuai dengan urutan gen penyandi DNA Pol I *wild-type* kecuali untuk asam amino yang akan dimutasi. Perancangan

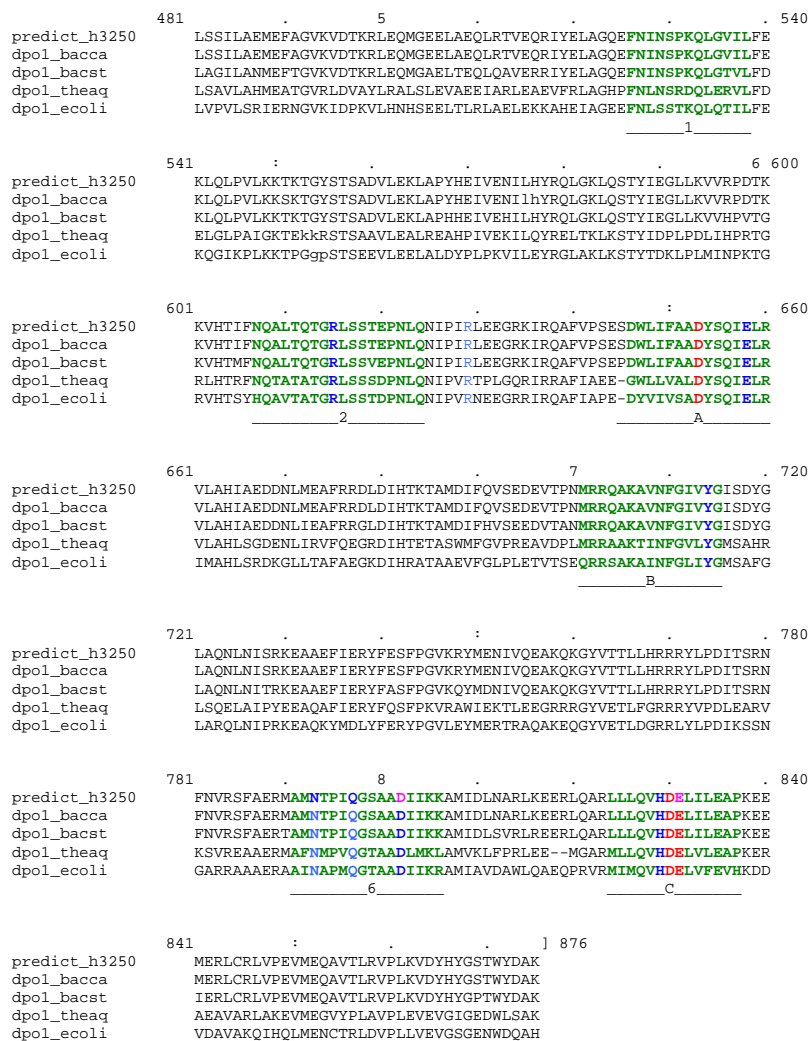
primer dilakukan dengan bantuan program komputer *Primer detective* dan *Genmon* versi 4.1. Untuk mengetahui hasil PCR mutagenik, maka dilakukan elektroforesis pada gel agarosa.

Transformasi sel *E.coli* GI724

Pembuatan sel kompeten, transformasi, isolasi DNA plasmid, elektroforesis gel agarosa, pemotongan DNA dengan enzim restriksi, pemurnian DNA, serta ligasi dilakukan dengan menggunakan metode standar (Sambrook & Russell, 2001).

Overekspresi DNA Pol I ITB

Koloni tunggal dari *E.coli* GI724 yang membawa plasmid pITB-9A (*wild-type*) dan plasmid mutan diinokulasi pada medium cair RM-A (1 X M9 salts; 2% *casamino acid*; 1,0% gliserol; 1 mM MgCl₂; dan 100 µg/ml ampicilin) pada temperatur 30°C dengan pengocokan 200 rpm selama semalam. Kultur tersebut diinokulasi kembali dalam medium induksi (1 X M9 salts; 0,2% *casamino acid*; 0,5% glukosa; 1 mM MgCl₂; 100 µg/ml ampicilin) dengan OD₅₅₀ 0.1. Kemudian diinkubasi pada 30°C dengan pengocokan 200



Gambar 1. Daerah lestari pada ujung C domain polimerase. Urutan nukleotida DNA polimerase termotabil isolat lokal (Predict h 3250) dibandingkan terhadap DNA polimerase *B.caldotenas*, *B.stearothermophilus*, *T. aquaticus*, dan *E.coli*. Daerah lestari /motif yang terdiri dari (1, 2, 3 atau motif A, 4 atau motif B, 5 atau motif C, dan 6) ditandia dengan (--). Residu asam-asam amino lestari dicetak dengan tinta biru dan sisi aktif enzim dicetak dengan tinta merah; Sedangkan residu asam amino yang dimutasi dicetak dengan tinta ungu (Ambarsari *et al.*, 2004).

rpm hingga dicapai OD₅₅₀ 0,5. Setelah itu pada kultur ditambahkan triptofan dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml dan kultur kembali diinkubasi tetapi pada temperatur 37°C dengan pengocokan 200 rpm selama 3 jam. Selanjutnya sel dipanen dengan cara sentrifugasi dan pelet sel disuspensikan dalam bufer lisis. Ekstrak kasar protein diperoleh dengan cara sonikasi dan dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE.

3. Hasil dan Pembahasan

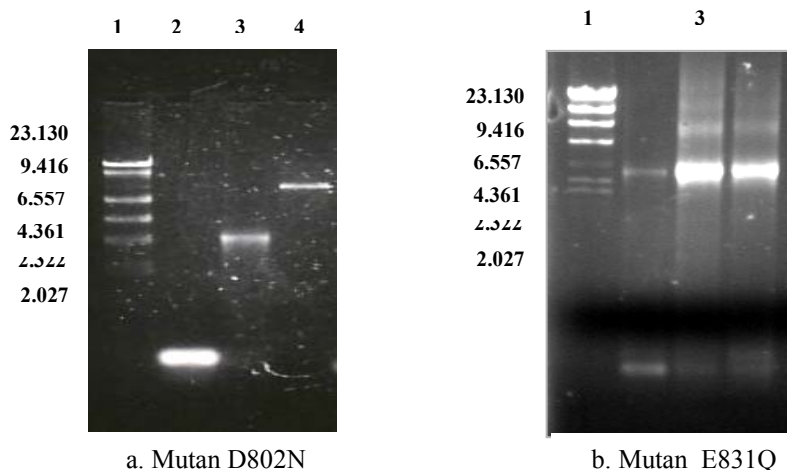
Analisis homologi pada domain polimerase DNA Pol I ITB

Berdasarkan hasil analisis homologi dengan bantuan program *predictprotein* didapatkan bahwa urutan asam amino gen penyandi DNA Pol I ITB mempunyai kemiripan yang tinggi dengan *B.caldotenus*, *B.stearothermophilus*, *T.aquaticus*, dan *E.coli* masing-masing adalah 99%, 88%, 44%, dan 41%. Dengan analisis yang sama diperoleh letak domain yang

terdapat pada DNA pol I ITB yaitu domain eksonuklease 3'-5' (pada bagian tengah urutan asam amino), domain eksonuklease 5'-3' (pada bagian ujung-N), dan domain polimerase 5'-3' (pada bagian ujung-C). Ujung-N urutan asam amino hasil deduksi mengandung enam motif eksonuklease 5'-3', yaitu motif A,B,C,D,E, dan F (Pramono, 2004). Sedangkan pada ujung-C terdapat motif 1, 2, 3 (A), 4 (B), 5 (C), dan 6 yang dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil peninjauan ini juga diperoleh beberapa residu asam amino lestari antara lain

Asp⁶⁵³ (homolog dengan Asp⁶¹⁰ pada *Taq*, Asp⁶⁵³ pada *Bst*, dan Asp⁷⁰⁵ pada *E.coli*) yang terletak pada motif A dan residu Asp⁸³⁰, Glu⁸³¹ (homolog dengan Asp⁷⁸⁵, Glu⁷⁸⁶ pada *Taq*; Asp⁸³⁰, Glu⁸³¹ pada *Bst*; Asp⁸⁸², Glu⁸⁸³ pada *E.coli*) yang terletak pada motif C. Residu asam amino tersebut merupakan sisi aktif enzim yang terletak pada subdomain



Gambar 2. Elektroforegram hasil PCR. (a). DNA λ/*Hind* III, (1); hasil PCR 1 (±200 bp), (2); hasil PCR 2 (± 2630 bp), (3); Templat/pITB₉ (± 6230 bp), (4) (Ambarsari *et al.*, 2004). (b). DNA λ/*Hind* III, (1); hasil PCR 2 (± 2630 bp), (3)

Tabel 1. Hasil analisis penentuan urutan nukleotida (Ambarsari *et al.*, 2004).

	Urutan Nukleotida
Vektor kloning	GGGAGCGCCGCT <u>GAC</u> ATTATTAAAAAGGCGATGAT ***** GGGAGCGCNGCT <u>AAC</u> ATTATTAAAAAGGCGATGAT
Vektor ekspresi	GGGAGCGCCGCT <u>GAC</u> ATTATTAAAAAGGCGATGAT ***** GGGAGCGCNGCT <u>AAC</u> ATTATTAAAAAGGCGATGAT

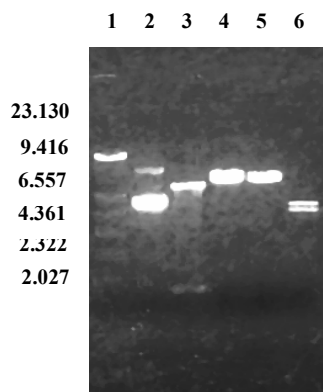
palm. Residu asam-asam amino lain yang juga lestari terlihat pada beberapa daerah lainnya (Gambar 1).

Konstruksi Mutan D802N dan E831Q

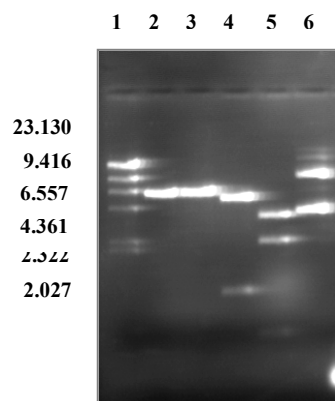
Residu asam amino yang dimutasi merupakan residu yang lestari, yaitu Asp⁸⁰² pada motif 6 dan Glu⁸³¹ pada motif 5 (C), dan informasi residu tersebut masih belum diungkapkan. Pada penelitian ini Aspartat dimutasi menjadi Asparagin (D802N) dan Glutamat menjadi Glutamin (E831Q) dengan mengganti gugus -CO₂ menjadi -CONH₂, penggantian ini tidak mengubah struktur (isosterik). Mutan D802N dikonstruksi dengan metode PCR megaprimer dan gen mutan diperoleh setelah melalui dua tahap proses PCR. Tahap pertama PCR menghasilkan amplikon dengan ukuran sekitar

dengan ukuran sekitar 2600 bp yang merupakan gen mutan D802N, dan hal yang sama dilakukan terhadap mutan E831Q. Amplikon PCR pertama dan kedua dapat dilihat pada Gambar 2a dan 2b.

Fragmen DNA mutan D802N yang telah dikonstruksi, diklon ke dalam vektor kloning pGEM-T kemudian dilakukan subklon ke dalam vektor ekspresi pTrxFus. Sedangkan mutan E831Q diklon langsung ke dalam vektor ekspresi pTrxFus. Untuk mendapatkan klon transforman yang membawa DNA plasmid rekombinan (yang telah termutasi), maka dilakukan karakterisasi, yaitu memotong DNA plasmid tersebut dengan beberapa enzim restriksi. Gambar 3 menunjukkan hasil pemotongan DNA plasmid rekombinan untuk

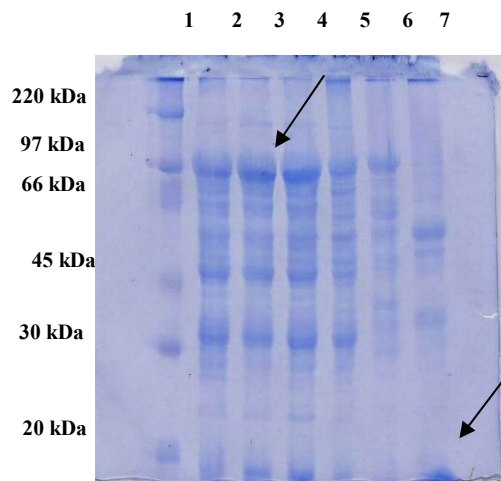


Gambar 3 Elektroforegram hasil analisis restriksi plasmid pGEM-T rekombinan mutan D802N. 1, DNA λ /*Hind*III, 2. DNA plasmid uncut, 3. DNA plasmid/*Eco*RI (\pm 4973 bp dan \pm 627 bp), 4. DNA plasmid/*Kpn*I (\pm 5600 bp), 5. DNA plasmid/*Bam*HI (\pm 5600 bp), 6. DNA plasmid/*Kpn*I dan *Bam*HI (\pm 3000 bp dan \pm 2600 bp) (Ambarsari *et al.*, 2004).



Gambar 4. Elektroforegram hasil analisis restriksi plasmid pTrxFus rekombinan mutan E831Q. 1. DNA λ /*Hind*III 2. DNA plasmid/*Kpn*I (\pm 6200 bp) 3. DNA plasmid/*Bam*HI (\pm 6200 bp) 4. DNA plasmid *Pst*I (\pm 5000 dan 1000 bp) 5. DNA plasmid/*Hind*III (\pm 3000, 2000 dan 500 bp) 6. DNA plasmid uncut

200 bp (yang disebut sebagai megaprimer) dan tahap kedua PCR diperoleh amplikon mutan D802N. Hasil pemotongan baik dengan *Bam*HI maupun *Kpn*I diperoleh 1 pita DNA



Mutan D802N

Gambar 5. Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi tinggi DNA polimerase mutan. 1. marker protein; 2, 5, 6. DNA polimerase *wild-type*, 3 dan 4. DNA polimerase mutan; 7. pTrx (Tioredoksin).

dengan ukuran 5600 bp, pemotongan dengan *EcoRI* dihasilkan 2 pita DNA dengan ukuran masing-masing sekitar 4973 bp dan 627 bp, dan pemotongan dengan (*BamHI*, *KpnI*) dihasilkan 2 pita DNA dengan ukuran sekitar 3000 bp dan 2600 bp. Tabel 1 menunjukkan hasil analisis melalui penentuan urutan nukleotida.

Gambar 4 menunjukkan hasil pemotongan DNA plasmid rekombinan untuk mutan E831Q. Hasil pemotongan dengan *BamHI* maupun *KpnI* diperoleh 1 pita DNA dengan ukuran 6200 bp, pemotongan dengan *PstI* dihasilkan 2 pita DNA dengan ukuran masing-masing sekitar 5000 bp dan 1000 bp, pemotongan dengan *HindIII* (*KpnI*) dihasilkan 2 pita DNA dengan ukuran sekitar 3000 bp dan 2600 bp.

Overekspresi Mutan D802N dan E831Q

Untuk mengetahui ekspresi mutan D802N dan E831Q, maka plasmid rekombinan ke dua mutan tersebut digunakan untuk mentransformasi sel *E.coli* GI724. Protein mutan akan terekspresi setelah diinduksi dengan triptofan yang dapat diamati dengan terlihatnya pita tebal pada elektroforegram SDS-PAGE. Berat molekul protein yang diperoleh sekitar 112 kDa yang merupakan fusi antara protein mutan dengan tioredoksin yang berukuran sekitar 12 kDa (Gambar 5).

4. Kesimpulan

Hasil analisis homologi menunjukkan bahwa urutan asam amino pada gen penyandi DNA polimerase termasuk di dalam kelompok DNA

pol I atau famili A. Selain aktivitas polimerase juga ditemukan adanya aktivitas eksonuklease 5'-3' dan eksonuklease 3'-5'. Sisi aktif enzim ditunjukkan dengan adanya residu asam amino yang mengandung gugus karboksilat yang terletak pada motif A (Asp 653) dan motif C (Asp 830, Glu 831).

Mutan D802N dan E831Q telah berhasil dikonstruksi dan diekspresi secara heterolog di *E.coli* GI724 dan berat molekul protein fusi hasil ekspresi diperoleh sekitar 112 kDa.

5. Daftar Pustaka

- Adams M.W.W., Kelly R.M., (1998), Finding and Using Hyperthermophilic Enzymes. *Tibtech.*, **16**, hal. 329-332.
- Akhmaloka, Pramono H., Tika I.N., Suharto A., Retnoningrum D.S., Sindumarta M., Padmawinata K., dan Oei B.L., (2000b). Eksplorasi potensi bakteri termofilik isolat lokal: Studi kasus DNA polimerase termostabil, *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi III*, Cibinong 7-9 Maret 2000: 31-39
- Ambarsari L., Pramono H., Madayanti F., Moeis M.R., Akhmaloka, (2004). Konstruksi dan Overekspresi Gen Penyandi DNA Polimerase I Mutan dari Bakteri Termofil Isolat Lokal, *Hayati*, **11** (3), hal. 115-120.
- Barik S., (1997). Mutagenesis and Gene Fusion by Megaprimer PCR. Di dalam: White B.A., (ed)., *PCR Cloning Protocols*, Humana Press Inc, New jersey, hal. 173-182.
- Blondal T., Thorbjarnardottir S. H., Kielleczawa J., Hjorleifsdottir S., Kristjansson J.K., Enarsson J.M., and Eggertsson G., (2001), Cloning, sequence

- analysis and functional characterization of DNA polymerase I from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **34**, hal. 37-45
- Choi J.J., Jung S.E., Kim H., Kwon S., (1999). Purification and Properties of *Thermus filiformis* DNA Polymerase Expressed in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **30**, hal. 19 – 25.
- Joyce C.M., Steitz T.A., (1994). Function And Structure Relationships In DNA Polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, hal. 773 – 822.
- Kiefer J.R., Mao C., Hansen C.J., Basehore S.L., Hogrefe H.H., Braman J.C., Beese L.S., (1997). Crystal Structure of a Thermostable Bacillus DNA Polymerase I Large Fragment at 2.1 Å Resolution, *Structure*, **5**, hal. 95-108.
- Li Y., Korolev S., Waksman G., (1998). Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation, *The EMBO Journal*, **17** (24), hal. 7514-7525.
- Patel P.H., Loeb L.A., (2000). DNA Polymerase Active Sites is Highly Mutable: Evolutionary Consequences, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **97**, hal. 5095 – 5100.
- Patel P.H., Suzuki M., Adman E., Shinkai A., Loeb L.A., (2001), Prokaryotic DNA Polymerase I: Evolution, Structure, and “Base Flipping” Mechanism for Nucleotide Selection, *J. Mol.Biol.*, **308**, hal. 23-837.
- Pramono H. (2004). Kloning dan Ekspresi di *Escherichia coli* Gen DNA Polimerase I Bakteri Termofilik Isolat Cimanggu. Disertasi Doktor, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.
- Sambrook J., Russell D.W., (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed., ke-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Uemori T., Ishino Y., Doi H., and Kato I., (1995), The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium occultum* has two alpha-like DNA polymerases, *J. Bacteriol.*, **177**(8), hal. 2164-2177



Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitor Active Constituents From The Twigs of *Taxus sumatrana*

L. B. S. Kardono¹, Lince Yarni², Chairul³, and S. Suryowidagdo⁴

¹) Research Center for Chemistry, Indonesian Institute of Sciences, Kawasan PUSPITEK Serpong, Indonesia

²) National Drug and Food Control Agency, Jl. Percetakan Negara 23, Jakarta, Indonesia

³) Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Jl. Ir. H. Djuanda 22, Bogor, Indonesia

⁴) Department of Pharmacy, University of Indonesia, Depok, Indonesia

Abstract

*In the program for the research of bioactive compounds from Indonesian rain forest plants water-and organic-soluble extracts of the twigs of *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels have been evaluated for their α -glucosidase inhibitor activity. The ethanol- and ethyl acetate-soluble extracts showed significant activity ($IC_{50} \pm 15 \mu\text{g/ml}$). From phytochemical preliminary evaluation, it was suggested that the active compounds were probably either flavonoids or taxane diterpenoids. Further isolation work using high performance liquid chromatography, a known anticancer paclitaxel has been isolated, as one of the active compounds.*

Paper is on page 1070

Kajian Kimia Liken dan Kajian Kimia Tumbuhan Berbunga

Laily B. Din, Mohd Wahid Samsudin, Zuriati Zakaria, Ikram M. Said & A. Latiff

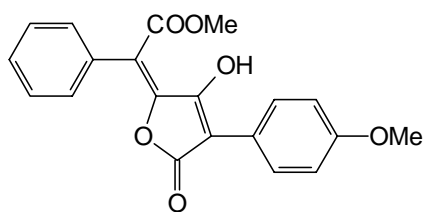
Program Sains Kimia & Teknologi Makanan,
Fakulti Sains & Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600, Bangi, Selangor, Malaysia

Abstrak

Penyelidikan taburan dan fitokimia liken dan tumbuhan berbunga telah dijalankan di Universiti Kebangsaan Malaysia sejak daripada tahun 1980an. Banyak data telah berjaya di jana hasil daripada aktiviti penyelidikan ini. Dalam makalah ini sejarah, perkembangan serta kemajuan penyelidikan mengenai liken dan tumbuhan berbunga akan di bentangkan.

1. Perbincangan

Dua bibliografi telah melaporkan secara umum aktiviti penyelidikan liken yang telah dijalankan di Malaysia (Galloway et al. 1994; 1997). Salah seorang penyelidik Malaysia yang terawal yang melaporkan taburan dan ekologi liken di Bukit Bendera, Pulau Pinang ialah Sammy (1975). Sementara kajian kimotaksonomi liken yang pertama dilakukan oleh penyelidik Malaysia telah melaporkan pemencilan dan pencirian asid pinastrik daripada liken *Lepraria candelaris* yang sekarang dikenali sebagai *Chrysothrix candelaris* (Sam 1979).



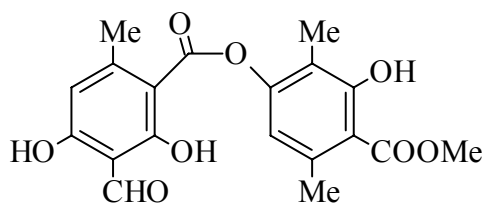
Asid pinastrik

Laporan-laporan ini telah mendorong beberapa orang penyelidik Universiti kebangsaan Malaysia memulakan kajian liken melalui pengutipan spesimen liken pada tahun 1980 dari beberapa tempat di Malaysia, terutama di kawasan tanah tinggi seperti Bukit Bendera, Bukit Fraser, Cameron Highlands dan Genting Highlands di Semenanjung Malaysia, sementara pengutipan liken di Sabah dijalankan di Gunung Kinabalu dan Gunung Alab yang

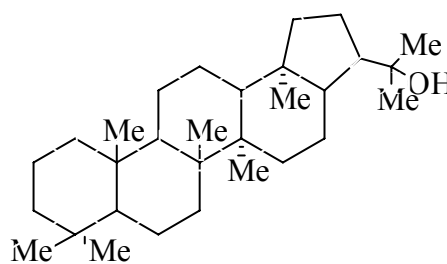
sebahagian daripada hasil kajian telah dilaporkan (Din et al. 1992). Pengutipan liken juga dijalankan di Bario, Sarawak dalam tahun 1995 dan di Gunung Jerai, Kedah serta Bukit Larut, Perak dalam tahun 1996.

Pengutipan liken di Cameron Highlands telah berjaya menemukan satu spesies liken baru yang kami namakan sebagai *Ramalina cannonii* (Elix et al. 1991) sempena nama Dr Jack R. Cannon, mantan Chairman, the Network for the Chemistry of Biologically Important Natural Products, yang telah membantu kami dalam penyelidikan sebatian semulajadi (natural products). Kajian liken di Dataran Kelabit Bario, Sarawak juga telah mencatatkan penemuan satu spesies baru yang kami namakan *Parmotrema barioense*, mengambil sempena Bario (Elix et al. 1997).

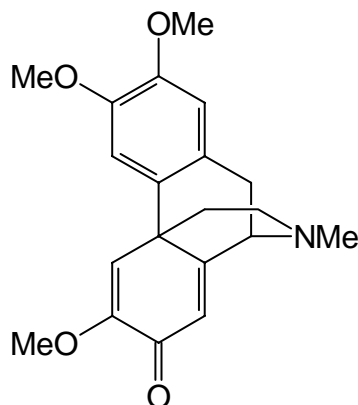
Beberapa rekod baru liken di Semenanjung Malaysia telah ditemui, misalnya *Cladia aggregata* (Zakaria et al. 2000) dan *Heterodermia flabellate* (Din et al. 2002) yang dikutip di kawasan peranginan Gunung Jerai, Kedah. Kajian ke atas *Heterodermia flabellate* telah berjaya memencilkan dua metabolit sekunder iaitu atranorin (sejenis depsida) dan zeorin (sejenis triterpenoid). Sementara liken *Cladonia siamea* yang tumbuh melata dipermukaan pasir di sepanjang jalan di antara Bario Asal dengan Kampung Pa'Ukat di Dataran Kelabit Bario, Sarawak merupakan salah satu rekod baru liken Borneo (Din et al.



Atranorin



Zeorin



N-Metil-2,3,4-trimetoksimorfinandien-7-on

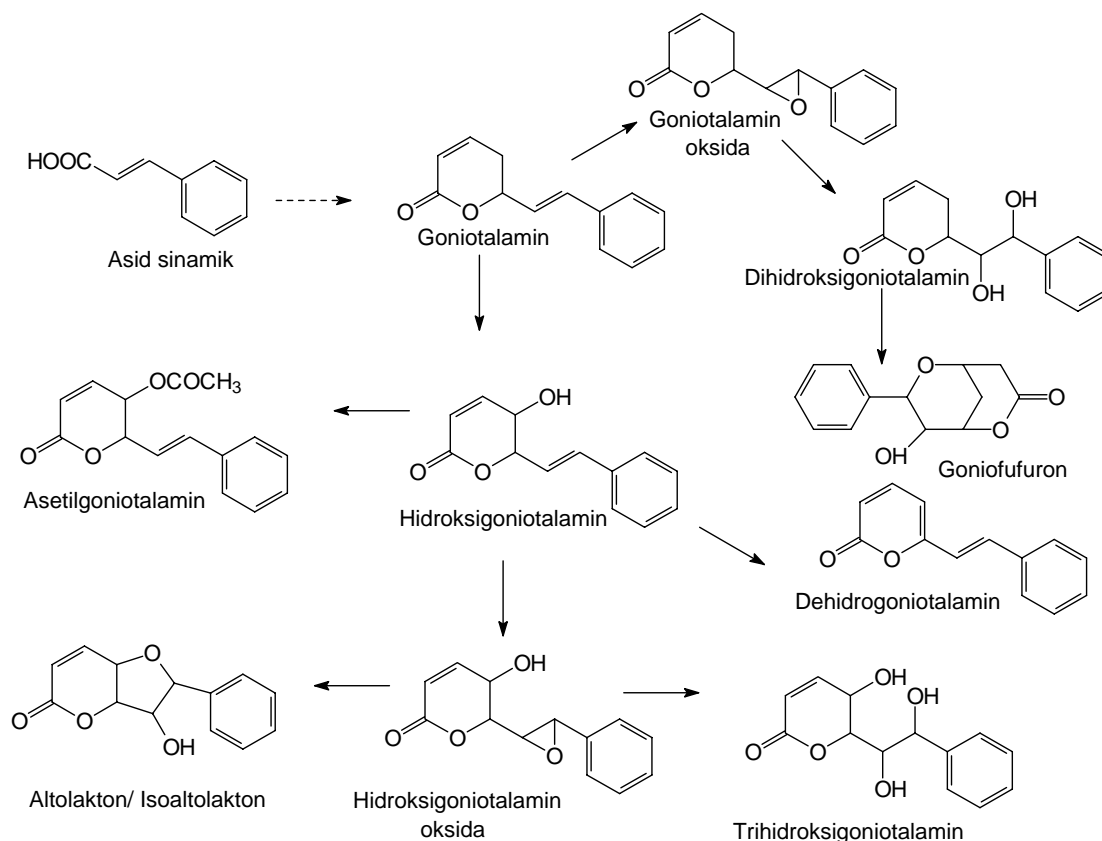
1995).

Selain liken, tumbuhan berbunga juga menjadi tumpuan penyelidikan fitokimia Kumpulan Penyelidik Sebatian Semulajadi (KPSS), Universiti Kebangsaan Malaysia. Kajian fitokimia tumbuhan berbunga bermula dengan aktiviti penyaringan fitokimia tumbuhan berbunga di kawasan hutan simpan PERHILITAN Bukit Rengit, Pahang pada bulan Februari 1985 (Lajis & Din 1985). Satu daripada tumbuhan yang dikutip iaitu *Alseodaphne perakensis* (Lauraceae) telah dikaji kandungan alkaloidnya. Sebatian alkaloid jenis sebiferina iaitu *N*-metil-2,3,6-trimetoksimorfinandien-7-on telah berjaya dipencil dan ditentukan strukturnya (Lajis et al. 1989).

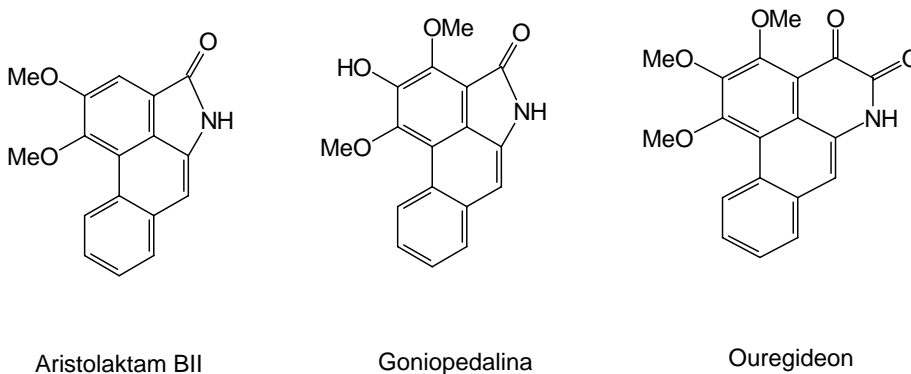
Seterusnya aktiviti penyaringan fitokimia, pengutipan sampel tumbuhan diikuti pengekstrakan, pemencilan dan penentuan struktur metabolit sekunder dilakukan. Famili tumbuhan yang telah diselidiki termasuklah Annonaceae, Apocynaceae, Lauraceae, Ebenaceae, Labiatae dan Logoniaceae yang sebahagian daripada hasil kajian ini telahpun dilaporkan (Din 2000).

Kajian fitokimia tumbuhan genus *Goniothalamus* (Annonaceae) paling banyak dijalankan berbanding tumbuhan lain. Ini amat berkaitan dengan kelimpahan 47 spesies *Goniothalamus* yang mudah dijumpai di Semenanjung Malaysia, Sarawak dan Sabah. Kajian morfologi, taburan dan habitat kesemua 47 spesies *Goniothalamus* ini telah dilaporkan dengan terperinci dan amat membantu penyelidikan yang dijalankan (Mat-Salleh 2001). Hasil kajian fitokimia beberapa *Goniothalamus* yang dijalankan diantara tahun 1990-2000 telah dilaporkan dalam Syarahan Perdana bertajuk Memburu Sebatian Semula Jadi Hutan Tropika Malaysia (Din 2000). Kajian menunjukkan sebatian goniotalamin sering ditemui dalam *Goniothalamus*, dan ini menunjukkan berkemungkinan besar goniotalamin bertindak sebagai pemula (Rajah 1) kepada pembentukan sebatian terbitan stirilpiron yang lain (Zakaria et al 2002).

Kajian fitokimia akar *Goniothalamus kinabaluensis* yang dikutip di banjaran Crocker, Sabah telah berjaya memencilkan tiga sebatian terbitan stirilpiron iaitu goniotalamin, hidroksigoniotalamin dan asetilgoniotalamin (Zakaria et al. 2002). Kajian akar dan kulit

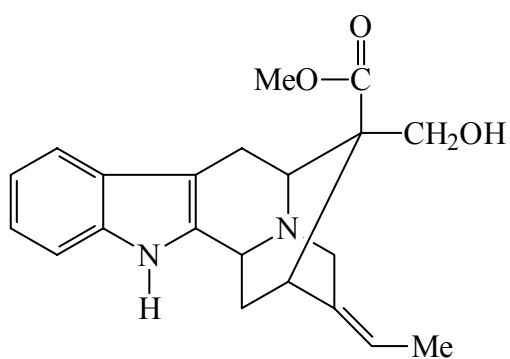


Rajah 1. Biosintesis Terbitan Stilirpiron

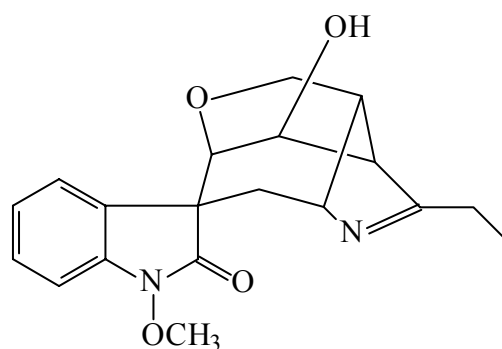


batang *Goniothalamus tomentosus* (Saunders 2003) yang dikutip di Hutan Simpan Sungai Jelok, Kajang, iaitu satu spesies baru dari Malaysia yang telah diperihalkan telah menghasilkan dua alakaloid iaitu aristololaktam BII, Goniopedalina dan ouregidion. Sebatian aristololaktam BII telah dipencilkan terdahulu daripada *G. velutinus* yang dikutip di Sabah (Omar et al. 1992).

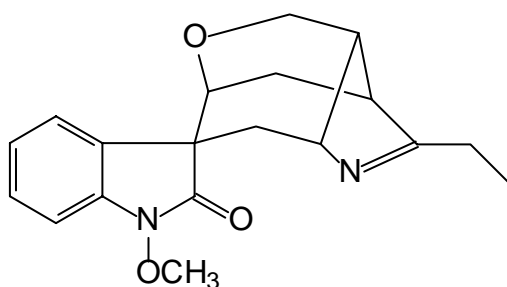
Kajian kimia ke atas daun *Gelsemium elegans* (Loganiaceae) yang dikutip di kawasan hutan Dataran Kelabit Bario, Sarawak telah menghasilkan empat alkaloid indola, 19-(Z)-akuammidina, 14-hidroksigelsenisina, gelsenisina dan gelsemina (Yusof et al. 2005). Tumbuhan ini adalah dari jenis yang memanjat dan menurut penduduk tempatan tumbuahn ini amat beracun dan boleh menyebabkan kematian jika termakan.



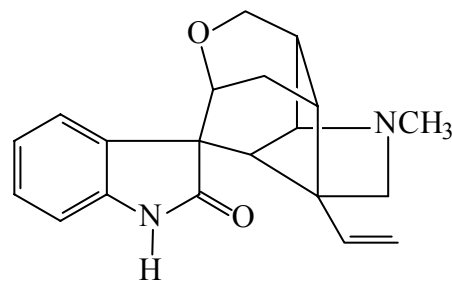
19-(Z)-Akuammidina



14-Hidroksigelsenisina



Gelsinisina



Gelsimina

2. Kesimpulan

Penyelidikan dalam kedua-dua bidang liken dan tumbuhan berbunga yang telah berjaya menjana maklumat asas berkaitan dengan taburan, sebatian semulajadi, kegunaan dan juga kepelbagaian biologi flora di Malaysia. Untuk terus menjayakan penyelidikan ini, pendekatan kerjasama dalam dan luar negeri akan memberi manfaat yang besar terutama kerjasama di antara negara membangun dengan negara membangun yang lain dan diantara negara membangun dengan negara maju. Selain itu latihan kepada penyelidik yang baru juga harus diusahakan untuk menjamin kesinambungan penyelidikan dalam bidang ini dimasa mendatang. Bantuan dalam bentuk kewangan, peralatan penyelidikan dan prasarana yang berkaitan harus diberi perhatian oleh semua pihak bagi menjamin penyelidikan yang baik seterusnya menghasilkan laporan dalam bentuk penerbitan yang berkualiti tinggi.

3. Penghargaan

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi kerana bantuan kewangan untuk menjalankan penyelidikan ini (IRPA: 09-02-02-0078 dan 09-02-02-0087 EA 228). Terima kasih kepada

pelajar siswazah yang bertungkus lumus menjalankan penyelidikan, penolong pegawai sains dan pembantu makmal kerana memberi bantuan teknikal. Terima kasih kepada penyelidik luar negara yang turut menjayakan penyelidikan ini iaitu Prof John A. Elix Australian National University (kajian liken) Prof Hiromatsu Takayama dari Chiba University, Japan (kajian fitokimia tumbuhan berbunga).

4. Rujukan

- Din, L.B. 2000. Memburu sebatian semula jadi hutan tropika Malaysia. UKM, Bangi. 60ms.
- Din, L.B., Ipor, I.B. & Fasihuddin, B.A. 1995. Additional lichen records from Indonesia and Malaysia. 1 *Cladonia siamea* des Abb. from Borneo. *Australasian Lichenological Newsletter*. **36**: 27-28.
- Din, L.B., Latiff, A., Zakaria, Z. & Elix, J.A 2002. Chemical constituents of the lichen, *Heterodermia flabellate* and *H. leucomelos* (Physciaceae) in Peninsular Malaysia. *Malayan Nature Journal* **56**(1): 1-3.
- Din, L.B., Zakaria, Z., Samsudin, M.W., Ahmad, I.B., Latiff, A., Yusoff, N.I. & Said, I.M. 1992. Studies of Malaysian lichen X: Distribution, chemotaxonomy and biological activity. In

- Khozirah Shaari et al. (eds.), *Medicinal products from tropical rain forests: Proceedings of the conference*. FRIM, Kuala Lumpur. 44-51.
- Elix, J.A., Din, L.B. & Samsudin, M.W. 1991. New species of *Ramalina* (lichenized ascomycotina) from Australia and Malaysia. *Mycotaxon*. XL:41-44.
- Elix, J.A., Din, L.B. & Ismail, G. 1997. New species and combinations in the lichen genus *Parmotrema* (Ascomycotina, Parmeliaceae) from Malaysia and Papua New Guinea. *Mycotaxon*. LXII: 341-347.
- Galloway, J.G., Din, L.B. & Latiff, A. 1997. An additional bibliography of Malaysian lichenology. *Malaysian Applied Biology* 26: 93-99
- Galloway, J.G., Samsudin, M.W. & Latiff, A. 1994. A bibliography of Malaysian lichenology. *Malaysian Applied Biology* 22: 215-221.
- Yusof, H., Din, L.B., Zakaria, Z. & Mat-Salleh, K. 2004. The chemical constituents of the stem bark and roots of *Goniothalamus tomentosus*. *Sains Malaysiana* 23: 67-73.
- Lajis, N.H. & Din, L.B. 1985. Report on the phytochemical survey conducted at the Krau Game Reserve, Lancang, Temerloh, Pahang. In Lajis, N.H. et al. (eds.), *Aspects of Natural Product Chemistry: The phytochemical survey, proceedings of a workshop*. UPM, Serdang. 20-31
- Lajis, N.L., Mahmud, Z., Din, L.B. & Toia, R.F. 1989. N-methyl-2,3,6-trimethoxymorphinandien-7-one, the major alkaloid from *Alseodaphne perakensis*. *Pertanika* 12(3):421-424.
- Mat-Salleh, K. 2001. New and noteworthy species of Bornean *Goniothalamus* (Annonaceae). *Folia Malaysiana* 2(2): 75-116.
- Omar, S., Chee, C.L., Ahmad, F., Niu, J.X., Jaber, H., Huang, J. & Nakatsu, T. 1992. Phenanthrene lactams from *Goniothalamus velutinus*. *Phytochemistry* 31: 4395-4397.
- Saunders, R.M.K. 2003. A synopsis of *Goniothalamus* species (Annonaceae) in Peninsular Malaysia, with a description of a new species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 321-339.
- Sam, T.W. 1979. Malaysian lichen flora: Chemotaxonomy identification of *Lepraria candelaris*. *Malayan Nature Journal* 33: 113-114.
- Sammy, N. 1975. An annotated list of lichens from Penang. *Malay. Nat. J.* 28: 214-216.
- Zakaria, Z., Din, L.B., Ahmad, F.B., San, C.H. & Mat-Salleh, K. 2002. Styrylpyrone derivatives from *Goniothalamus kinabaluensis* (Annonaceae). *ACGC Chemical Research Communications*, 15: 72-77.
- Zakaria, Z., Din, L.B., Latiff, A. & Elix, J.A. 2000. Notes on the morphology and chemical constituents of lichens, *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. In Peninsular Malaysia. *Malayan Nature Journal* 54(1): 27-30.

Acrylic Nanosensors for the Interrogation of Chemical Content in Microorganisms

Lee Yook Heng¹⁾, Elizabeth A. H. Hall²⁾, Alan Tunnacliffe²⁾, Musa Ahmad*

¹⁾School of Chemical Sciences & Food Technology
Faculty Science & Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor, Malaysia

*Corresponding author: yhl1000@pkriscc.ukm.my

²⁾Institute of Biotechnology, University of Cambridge, CB2 1QT, England, UK.

Abstract

An understanding of the chemical content of cells can give information regarding cell physiology and biochemistry, which have important implication to medical and biomedical research. However, most conventional analytical techniques cause perturbation of the cells and alter biochemical processes at cellular level. Therefore they are not suitable for chemical analysis at cellular environment. In this paper, we described the design, synthesis and characterization of micro- and nanospheres impregnated with sensing agent for the detection of ions at cellular level. These nanosensors are capable of detection pH changes in the body of microorganism such as rotifer.

Keywords: *Acrylic polymer, nanosensor, rotifer, ion-sensors, photopolymerisation*

1. Introduction

Interrogation of cellular content is chemical analysis with the sample size reduces to nano- or micrometer domain. Such a domain of chemical analysis is extremely challenging because meaningful result can only be obtained if a single cell or sub-compartment of a living cell is investigated. Various chemical and physical parameters to be measured under a single and living cell environment require high spatial resolution and negligible perturbation, which may alter the cell chemistry and biological behaviour. Therefore, the techniques employed in such measurements are non-invasive and should involve sensing devices that are of sub-micron or nano-size. Eliminating chemical interference and invasive problem in the analysis of cellular content can be performed by the use of nanoparticles, examples are metallic-nanoparticles called quantum dot (Sharron et al, 2003). and polymeric micro- or nanospheres. Quantum dots have been successfully used in assay of breast cancer cells (Parak et al, 2002) and

imaging of cell motility (Dubertret et al, 2002).

The use of polymer matrix in the design of nanosensors is an advantage when compared to quantum dots because polymer matrix can be tailored make to immobilize various fluorescent reagents or sensing materials including biomolecules. The methacrylic-acrylic based polymers has been shown to be potential matrices for both chemicals sensors (e.g. ions) (Lee and Hall, 1996, 2000, 2004; Lee et al, 2003) and biosensors (Lee et al, 2003, Low et al, 2004). The versatility in the polymer design provided by this class of polymers allow nanoparticles with the right hydrophilicity/hydrophobicity to be designed for simple immobilization of sensing reagent and chemical/physical properties that suitable to be used under cellular environment.

In this paper, we described the design, synthesis and chemical/physical characterization by optical microscopy of the micro- and nano-polymeric spheres for sensor application. The procedures for the immobilization of sensing reagents (ionophores

and chromoionophores) are also discussed. Preliminary application of the optical nanosensors to the microorganism rotifer was demonstrated.

2. Experimental

Synthesis of acrylic nanospheres

Acrylic micro- and nanospheres were synthesized by a photopolymerisation procedure using a mixture of n-butyl acrylate (nBA), cross-linker hexanedioldiacrylate (HDDA) and AIBN initiator in polyethylene glycol (PEG) solution. The mixture is first degassed with nitrogen followed by sonication before exposure to UV radiation in a RS UV exposure unit. The amount of nBA, HDDA, AIBN and PEG was varied and its effect on the properties of the micro- and nanosphere was studied. The product from photopolymerisation was purified by filtration and rinsed with THF several times. The volume of the milky filtrate, which contained the micro- and nanospheres was reduced by a rota-evaporator.

A solution of of chromoionophore, potassium tetrakis(fluorophenyl) borate (KTFPB) in THF was prepared and used for introducing the sensor materials by absorption into the nanospheres. For sensor used for potassium ion detection, valinomycin antibiotic was also added to the THF solution. The THF was removed completely by evaporation with a rota-evaporator. The dry residue was then re-suspended again in water and finally filtered through a nylon membrane to remove flakes of chromoionophore I. The final suspension is a blue coloured colloidal solution.

Characterisation of nano-spheres with optical/fluorescent microscopies

The size of the acrylic micro- and nano-spheres was estimated by optical and fluorescent microscopies. The optical microscope (Leia DMIRB) was equipped with a Nikon camera and a video TV to record images of the spheres. The magnification used was from 200 – 400X. The fluorescence microscope (Nikon) was used with an excitation wavelength of 510-560 nm (G2A) and magnification from 250-600 X. For estimating the size of spheres greater than 5 μm , a comparison with Sephadex beads of size 40-120 μm was carried out whilst for those with size < 5 μm , green fluorescent microspheres of size 3 μm were used for comparison purpose. The changes in colour

and fluorescent behaviour of the nanospheres in response to changes in pH and potassium ion were recorded using both optical and fluorescence microscopes.

Application of micro- and nanospheres to study rotifer organisms

Two different species of rotifer organisms were transferred to a multi-well microplate and acclimatized for 4 hours in the plate. 100 μL of nanosphere suspension was added to each well. The experiment was performed in triplicates. For comparison purpose, green fluorescent microspheres was also used in the rotifer experiment. Blank experiments (rotifer without addition of micro- or nanospheres) were also included. The ingestion of micro- and nanospheres by the rotifers was viewed under both optical and fluorescent microscopes.

Fluorescent spectrophotometric studies of acrylic nanosensors

Acrylic microspheres were immobilized with chromoionophore I and a lipophilic anion to construct pH sensitive nanosensors. For potassium ion-selective nanosensors, the microspheres were also immobilized with valinomycin apart from chromoionophore I and the lipophilic anion. A fixed amount of microsphere suspension was dispensed into a 96 well-plate and place in a fluorescent spectrophotometer (Cary). The samples were then illuminated under an excitation wavelength of 560 nm and the emission of each sample in individual well was scanned from 570 – 800 nm. The slits used were 10-20 nm while the detector voltage (PM tube) was from 800-1000 V.

For the pH sensitive nanosensor, the spectra were recorded for pH =1 to 13 and for potassium ion-selective nanosensor, spectra were taken at 0 M KCl (TrisHCl, pH 7) and at 1 M KCl (TrisHCl, pH 7). To examine the selectivity of the potassium ion-selective nanosensor, 1 M NaCl was used as an interference ions and the spectra of the response to Na ion were also recorded. For the potassium nanosensor, the experiments were performed in triplicates.

3. Results and Discussions

Optimisation of microsphere synthesis process

There are several factors that affect the yield, size distribution and aggregate formation of the

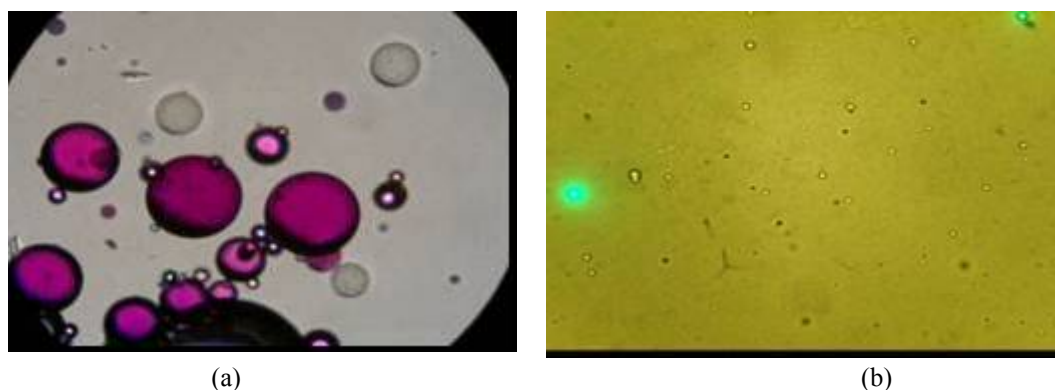


Figure 1 (a). A comparison of the size of the acrylic microspheres (red) with that of Sphadex beads (colourless spheres) of average size $80\ \mu\text{m}$ in diameter (200X magnification). (b). Size comparison of acrylic microspheres after filtration through a $5\ \mu\text{m}$ membrane with that of commercial available green fluorescent microspheres (standard size of $3\ \mu\text{m}$ in diameter). The white/black spheres are acrylic microspheres. ($\sim 400\text{X}$ magnification, fluorescence excitation: 410-460 nm for green microspheres)

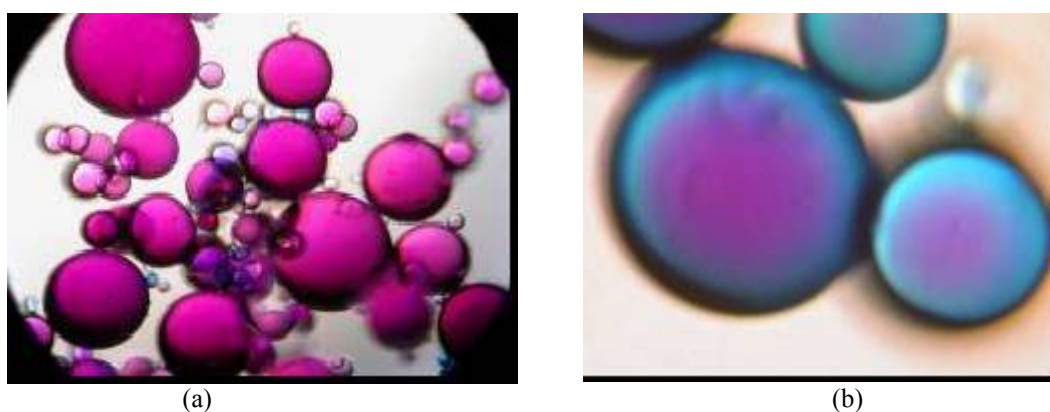


Figure 2. The changes of the red colour of microspheres (base form, not filter) to blue (acid form) after exposure to 1 M of HCl. (a) 0 min, and (b) 30 min. (magnification 100-200X). In contrast to the large microspheres, the smaller size microspheres, i.e. $< 3\ \mu\text{m}$ can response quickly to changes in acid-base condition

microspheres. These factors should be optimized to produce satisfactory quantity of microspheres with size distribution below $5\ \mu\text{m}$. The tackiness of the polymer should be adjusted so that the microspheres do not stick together to form large aggregates. For larger size microspheres ($> 40\ \mu\text{m}$), the size may be estimated by comparing with Sphadex beads of size from $40 - 120\ \mu\text{m}$. This is shown in Figure 1a. The colourless spheres are Sphadex beads of average size $80\ \mu\text{m}$ in diameter whilst the red spheres are acrylic spheres. Clearly, the acrylic spheres have average diameter range from $5\ \mu\text{m}$ to several hundreds of μm . Thus, filtration through a $5\ \mu\text{m}$ membrane is essential to isolate the smaller microspheres.

Filtration of the polymer mixtures through a $5\ \mu\text{m}$ membrane yielded microspheres of diameter sizes from $3\ \mu\text{m}$ to $< 3\ \mu\text{m}$. This is shown in Figure 1b where the size of the acrylic microspheres were compared with that of commercially available fluorescent microspheres (green colour) with uniform size of $3\ \mu\text{m}$. From this comparison, it appears that a typical acrylic microsphere suspension has a higher number of particles with size less than $1\ \mu\text{m}$.

Optical response of acrylic microspheres towards pH and potassium ions.

Upon immobilization of a chromoionophore in the acrylic microspheres, the microspheres assumed a red colour i.e. the base form of the chromoionophore. The absorption of

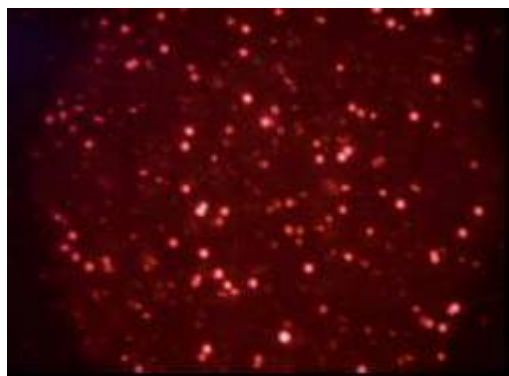


Figure 3. The fluorescent behaviour of microspheres (<math><5 \mu\text{m}</math> size and containing chromoionophore) in the base form after exposure of the acid form to 1 M NaOH for 10 mins. (Ex. 510-560 nm, magnification 600X)

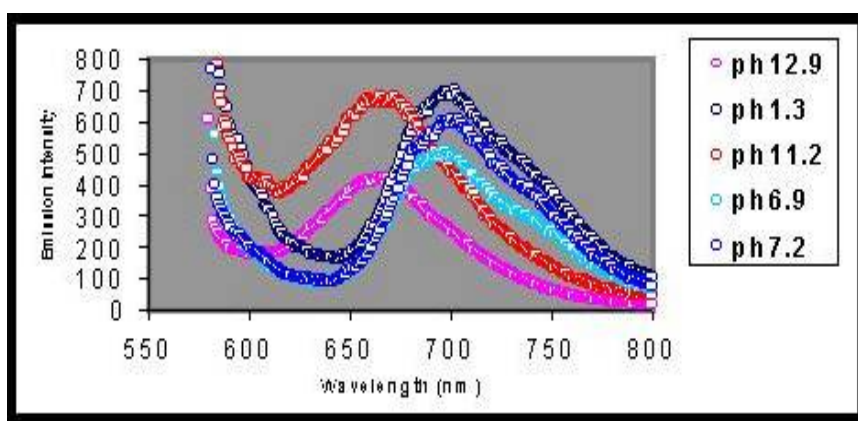


Figure 4. The emission spectra of pH sensitive acrylic nanosensors

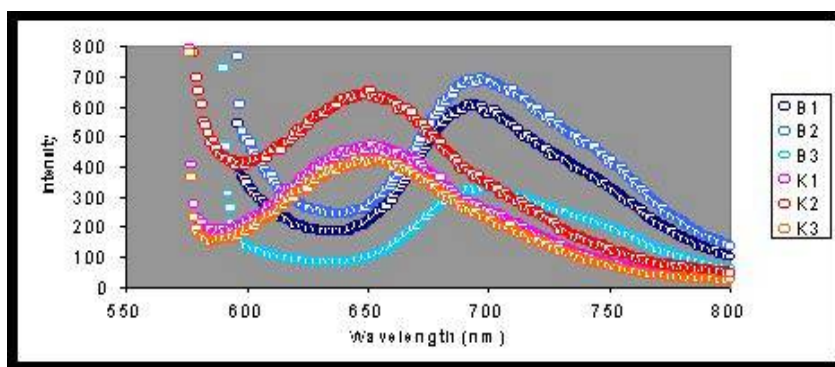


Figure 5. The emission spectra of potassium ion-selective nanosensors before (B) and after (K) exposure to 1 M KCl at pH=7

chromoionophore occurred in microspheres of all sizes (Figure 2 a). When exposed to acidic condition (e.g. 1 M HCl), the microsphere acted as a pH micro-sensor., where a gradual change of colour from red to blue occurs. The complete change of colour depends very much on the size of the spheres. Small spheres (<math><50 \mu\text{m}</math>) change colour completely in <math><5</math> min. But for larger spheres of several hundred

diameter, a complete change of colour cannot be attained even after 30 min. The process of colour change for these acrylic spheres proceeds from the surface of the microsphere first and then progresses towards the interior of the sphere (Figure 2b). From this observation, the transport of hydrogen ion within the acrylic matrices is slow. Thus, the use of large

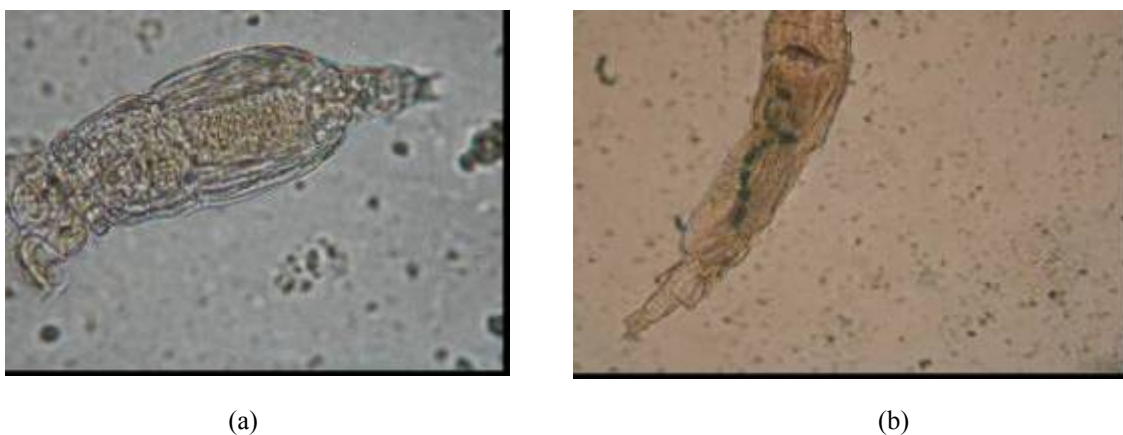


Figure 6. Feeding of rotifer with acrylic nanospheres: (a) Rotifer under acclimatized condition, no nano size spheres was fed. (b) Rotifer after fed with nano-spheres for several hours. More bluish-green spheres are found inside the guts of the organisms (Magnification: 200-300X)

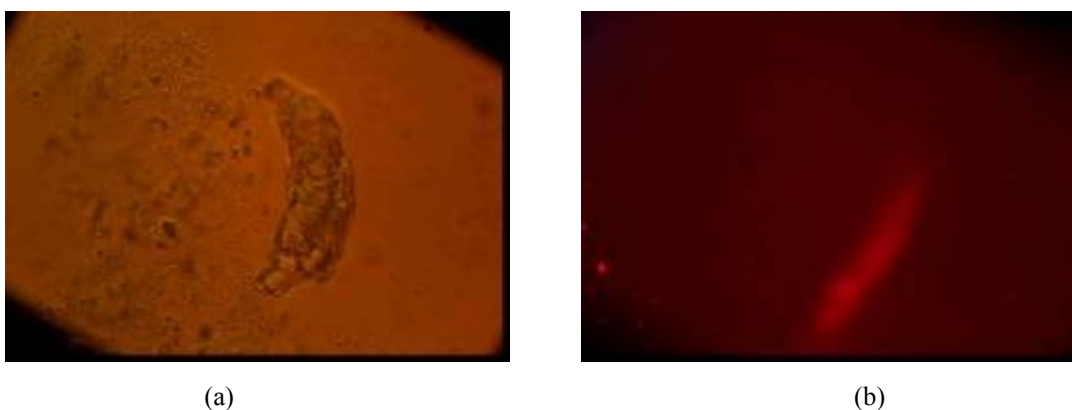


Figure 7. The fluorescent images of a rotifer that contain acrylic nanospheres: (a) In optical microscope, (b) under fluorescent irradiation of 510-560 nm (Magnification: 200X)

microsphere as micro-sensor may have unusually long response time.

Fluorescent response of acrylic nano- and microsphere

Microsphere containing chromoionophore not only can be used in the colorimetry transduction mode, it can be used in the fluorescent mode when excited with green light of 510-560 nm. When excited, these acrylic microspheres will give a red fluorescence. The intensity of the fluorescence depends on the acid-base forms of the chromoionophore. A little fluorescence was observed when most of the microspheres are in the acid form. But when NaOH is added, the number of fluorescent microspheres increases. Thus, under the excitation of 510-560 nm, the red form of the chromoionophore is more active and is preferable as a mean of transduction when the microspheres are used as an analytical tool (Figure 3).

Fluorescent spectrophotometric studies of acrylic nanosensors

The emission spectra of the nanosensors towards various pHs are depicted in Figure 4. Under alkaline conditions, the maximum emission recorded was close to 650 nm but this shifted to about 700 nm when the condition became less alkaline, i.e. from neutral to acidic. At alkaline condition, the predominant form for the chromoionophore is the deprotonated form and when the condition become acidic, the deprotonated form is converted to protonated form and hence the emission maxima shifted to about 700 nm.

The microspheres not only response to changes in pH condition, they can also response to a change in ion concentration such as potassium if an ionophore, e.g. valinomycin is incorporated together with the chromoionophore into the acrylic microspheres. The change of colour from blue to red as the

potassium ion penetrates into the spheres. Exposure to KCl leads to a rapid shift (< 1 min) of the emission maxima from 700 nm to 650 nm (Figure 5). This is in agreement with the deprotonation of the chromoionophore when valinomycin selectively complexed the potassium ions and extracted the ions into the acrylic spheres. However, when the nanosensors were exposed to NaCl under the same condition, there was no obvious shift in the emission spectra even after 10 min. But when KCl was added, a shift to 650 nm was again observed. This confirmed that the acrylic nanosensor is selective to potassium ion only but not sodium ion.

The emission maxima obtained here appears to be different. It has been reported that with excitation at 565 nm, emission peaks for protonated form were observed at 615 and 683 nm and for deprotonated form at 643 and 725 nm. The emission peaks obtained for the acrylic nanospheres are 650 nm (deprotonated), 700 nm (protonated) and a small shoulder at about 740 nm.

Response of nanospheres in rotifer feeding experiments

Acrylic nanospheres containing immobilized chromoionophore were fed to two species of rotifers. Both species of rotifers ingested the nanospheres within minutes after being fed. The nanospheres were clearly seen in the gut of the organisms. Under the optical microscope, a small amount of nanospheres was retained in the gut of the organisms, mostly near the jaw of the animal immediately after exposure to the nanospheres. But the gut was soon filled up after several hours of exposure (Figure 6b). While in the gut of the rotifer, the colour of the nanospheres turned to an intense blue colour. This may indicate that the gut of the animal is acidic and is the first time that the gut of the micro-organism is observed to be acidic.

The acidic nature of the gut can be confirmed by viewing the organisms under a fluorescence microscope. Using excitation of 510-550 nm, a weak fluorescence was observed (Figures 7). For a complete acid form, fluorescence should not be observed. The very weak fluorescence could only be observed under long exposure time of 4 seconds and it indicated that the base form still present in small quantities. Therefore, the gut of the animal is not extremely acidic. The organisms remain active even after a day

and this indicated the acrylic fluorescent nanospheres are non-toxic and suitable to be used in a living system.

4. Conclusion

The synthesis of acrylic microspheres/nanospheres based on cross-linked nBA matrix using photopolymerisation was successful. The conditions for synthesis of microspheres to yield size of < 5 µm in diameter and non-tacky spheres have been produced. Fluorescent spectrophotometry studies have demonstrated that the acrylic nanosensors can be used as pH and potassium ion-selective sensing in micro-environment. The nanosensors gave rapid response and showed good selectivity. By increasing the amount of micro- or nanospheres, a more sensitive nanosensor can be obtained. Optical and fluorescence microscopies demonstrated that these micro- or nanospheres can be used as nanosensors for the studying micro-organisms directly.

5. Acknowledgement

We thank the Royal Society, UK for awarding a fellowship to enable this work to be carried out at Cambridge University. We also like to show our appreciation to the Universiti Kebangsaan Malaysia for granting a sabbatical leave to Lee Yook Heng to visit Cambridge, UK.

6. References

- Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 298, 1759-1762.
- Lee Y. H, Toth K, Hall E. A. H.. 2004. Ion-transport and diffusion coefficients of non-plasticised methacrylic-acrylic ion-selective membranes. *Talanta*, 63, 73-87.
- Lee Y. H., Teh H. F., Loh H. C, Musa. A. 2003. Influence of methacrylic-acrylic copolymer composition on plasticiser-free optode films for pH sensors, *Sensors*, 3, 83-89.
- Lee Y. H, Hall E. A. H. 2000: Producing " Self-Plasticizing" Ion-Selective Membranes. American Chemical Society Publ., *Anal. Chem.* 72, 42-51.
- Lee Y. H, Hall E. A. H., 2000: Methacrylic-acrylic polymers in ion-selective membranes : achieving the right polymer recipe, Elsevier Science Publ., *Analytica Chimica Acta* 403, 77-89.
- Lee Y. H, Hall E. A. H., 1996: Methacrylate-acrylate based polymers of low plasticiser content

- for potassium ion-selective membranes. Elsevier Science Publ. *Analytica Chimica Acta*, 324, 47-56.
- Lee Y. H, Hall E. A. H.. 2000. Taking the plasticiser out of methacrylic-acrylic membranes for K⁺-selective electrodes. *Electroanalysis* , 12, 3, 187-193.
- Lee Y. H, Hall E. A. H.. 2000. One-step synthesis of K⁺-selective methacrylic-acrylic copolymers containing grafted ionophore and requiring no plasticiser. *Electroanalysis*, 12, 3, 178-186.
- Lee Y. H., Loh H. C., Musa. A. 2003. Biosensor potentiometrik untuk penentuan urea dan ketoksikan logam berat. *J. Sains Malaysiana*, 32, 43-51.
- Low S. B., Lee Y. H., Bohari M. Y., Musa A.. 2004 Photocurable ferrocene-containing pHEMA films for mediated amperometric biosensor. *Thin Solid Films* (In press).
- Parak, W.J., Boudreau, R, Le Grod M, Gerion D, Zanchet D, Micheel CM, William SC, Alivisatos AP, Larabell, C. 2002. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv. Mater*, 14, 882-885.
- Sharron G. P., Lin H., Michael J. N. 2003. Nanoparticles for bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 609-615.

Senyawa-senyawa sitotoksik dari tumbuhan *Artocarpus* (Moraceae)

Lia Dewi Juliawaty, Euis Holisotan Hakim, Yana Maolana Syah,
Sjamsul Arifin Achmad dan Lukman Makmur

Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia - FMIPA,
Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia
e-mail: liadewi@chem.itb.ac.id

Abstrak

Artocarpus merupakan salah satu genus tumbuhan dari famili Moraceae. Keanekaragaman yang tinggi dari tumbuhan ini ada di Indonesia, Malaysia dan Filipina. Genus ini diketahui mengandung senyawa jenis flavonoid, arilbenzofuran dan Diels – Alder adduk. Studi kimia terhadap beberapa spesies *Artocarpus* yang tumbuh di Indonesia memperlihatkan bahwa genus ini memiliki kandungan senyawa jenis flavonoid yang unik. Beberapa senyawa flavonoid tersebut memiliki pula sifat sitotoksik yang tinggi terhadap sel murine leukemia P388 sehingga tumbuhan *Artocarpus* dapat berpotensi sebagai sumber senyawa-senyawa yang bersifat anti tumor.

Kata kunci: *Artocarpus*, Moraceae, sel murine leukemia P388

1. Pendahuluan

Moraceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang terdistribusi di daerah tropis dan subtropis Asia. Famili ini memiliki 60 genus dan 1400 spesies (Jarret, 1959 ; Jarret, 1960). Salah satu genus utama dari famili ini adalah *Artocarpus*, selain *Morus*. Genus *Artocarpus* ini terdiri dari 50 spesies, dengan keanekaragaman tertinggi dapat ditemukan di Indonesia, Malaysia dan Filipina. Sekitar 30 spesies tumbuh dan tersebar di beberapa daerah di Indonesia. Tumbuhan ini merupakan pepohonan dan semak, tetapi sangat jarang ditemukan dalam bentuk perdu. Genus ini telah lama dipergunakan sebagai sumber bahan bangunan yang baik, buahnya sebagai sumber pangan, serta digunakan pula sebagai obat tradisional misalnya, obat batuk, disentri, dan malaria (Achmad, 2001 ; Achmad, 2002). Kandungan kimia tumbuhan ini antara lain adalah senyawa fenolik yang termasuk kelompok flavonoid, arilbenzofuran dan Diels-Alder adduk (Verheij, 1992, A, Heyne, 1978).

Senyawa flavonoid yang diperoleh dari *Artocarpus* umumnya terisoprenilasi, beberapa diantaranya memperlihatkan aktivitas sebagai inhibitor terhadap 5-lipoksigenasi arakidonat, antiplatelet, antibakteri, antioksidan dan sitotoksik.

Artocarpus dikenal dengan nama daerah 'nangka'. Sampai saat ini kurang lebih sekitar 15 spesies *Artocarpus* yang tumbuh di Indonesia telah diteliti kandungan kimianya di laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Institut Teknologi Bandung. Pada makalah ini akan dipaparkan hasil penelitian mengenai senyawa-senyawa flavonoid yang telah diisolasi dari tiga spesies *Artocarpus* yaitu *A. altilis*, *A. champeden* dan *A. lanceifolius* dan kajian sitotoksiknya terhadap sel murine leukemia P388.

Artocarpus altilis adalah spesies tumbuhan yang dikenal dengan nama daerah 'sukun', *A. champeden* dikenal dengan nama 'cempedak'. Sementara itu, *A. lanceifolius* adalah tumbuhan

langka yang endemik untuk Indonesia, dan mempunyai nama daerah 'keledang'.

2. Percobaan

Tumbuhan *A. altilis* diperoleh dari Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan, *A. lanceifolius* dari Kabupaten Padang-Pariaman, Sumatera Barat dan *A. champeden* diperoleh dari daerah di Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Jaringan tumbuhan dari ketiga spesies ini masing-masing diekstraksi dengan pelarut organik misalnya MeOH, dan ekstrak yang diperoleh dipartisi dengan beberapa pelarut yang nonpolar (benzen), kloroform sampai pelarut polar (aseton). Pemisahan dan pemurnian setiap fraksi dilakukan dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi, diantaranya kromatografi cair vakum, kromatografi gravitasi, kromatografi cair tekan, dan kromatografi radial. Senyawa murni yang diperoleh dianalisis strukturnya dengan menggunakan data spektroskopi yang meliputi spektroskopi ultra violet, infra merah, dan ^1H serta ^{13}C NMR.

Uji sitotoksisitas senyawa-senyawa hasil isolasi dilakukan terhadap sel murine leukemia P388 dengan menggunakan sel yang diperoleh dari Japan Foundation for Cancer Research yang dibiakkan dalam media RPMI-1640 yang disuplemen dengan 5% serum *fetal calf* dan kanamisin (Alley, 1988)

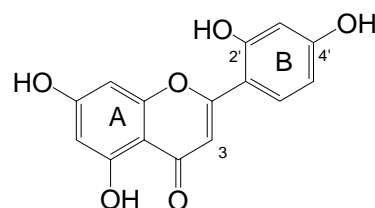
3. Hasil dan pembahasan

Hasil penelitian yang dilakukan terhadap tiga spesies *Artocarpus* yaitu *A. altilis*, *A. champeden*, *A. lanceifolius* telah berhasil mengisolasi berbagai jenis senyawa diantaranya jenis flavonoid, aril benzofuran, stilben, dan terpenoid. Walaupun demikian, senyawa flavonoid yang merupakan jenis flavon merupakan jenis senyawa utama yang ditemukan pada spesies-spesies tersebut. Senyawa-senyawa flavon yang diperoleh selanjutnya diuji sitotoksitasnya terhadap sel murine leukemia P388 dan sejumlah senyawa menunjukkan sifat sitotoksik yang sangat tinggi. Adapun senyawa-senyawa tersebut adalah sebagai berikut:

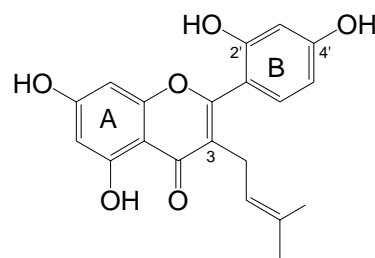
2',4'-Dioksigenasi flavon

Dari kulit akar *A. champeden* diisolasi norartokarpetin (**1**) (Achmad, 2005 ; Hakim, 2005). Senyawa ini jenis *2',4'*-dioksigenasi flavon yang paling sederhana ditemukan pada

spesies ini dan mempunyai aktivitas sitotoksik yang tinggi dengan nilai IC_{50} 5,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



(1)



(2)

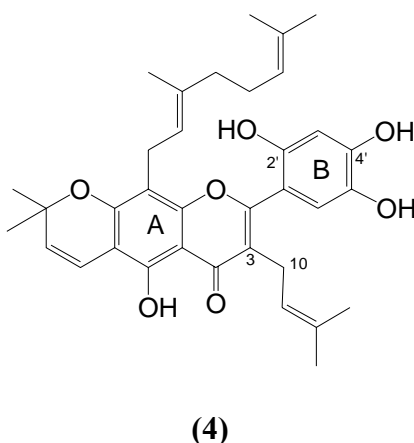
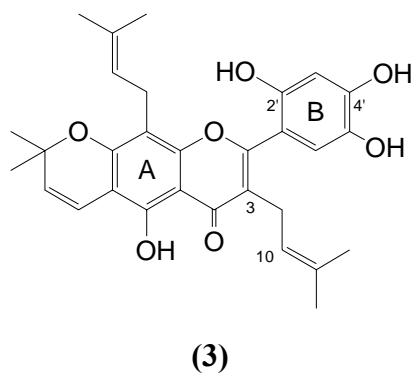
2',4'-Dioksigenasi 3-prenilflavon

Senyawa jenis *2',4'*-dioksigenasi 3-prenilflavon diperoleh dari kayu batang *A. champeden*, yaitu siklokomunol (**2**) (Achmad, 2005 ; Hakim, 2005) yang mempunyai nilai IC_{50} 9,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Dengan menganalisis struktur senyawa **1** dan **2** beserta aktivitasnya, dapat disarankan bahwa terikatnya gugus isoprenil pada C-3, senyawa **2**, maka menyebabkan aktivitas dari senyawa tersebut menjadi rendah.

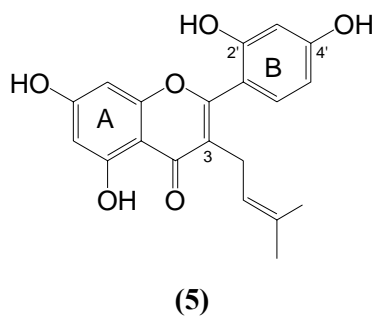
2',4',5'-Trioksigenasi 3-prenilflavon

Senyawa heterofilin (**3**) dan senyawa baru artoindonesianin U (**4**) merupakan jenis *2',4',5'*-trioksigenasi 3-prenilflavon dihidrobenzosanton yang diperoleh dari *A. champeden*. Keduanya memperlihatkan sitotoksitas yang tinggi dengan nilai IC_{50} 2,23 dan 2,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Syah, 2004 ; Achmad, 2005 ; Hakim, 2005). Sitotoksitas yang tinggi tersebut dapat disarankan karena adanya gugus hidroksi pada C-2', C-4', dan C-5' dan terbentuknya cincin 2,2-dimetilkromen. Walaupun demikian, adanya sedikit perbedaan nilai aktivitas antara **3** dan **4**, kemungkinan disebabkan karena perbedaan gugus pada C-8, untuk senyawa **3** yang terikat adalah isoprenil, sedangkan pada **4** adalah geranil.



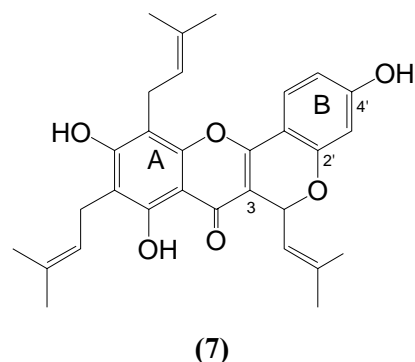
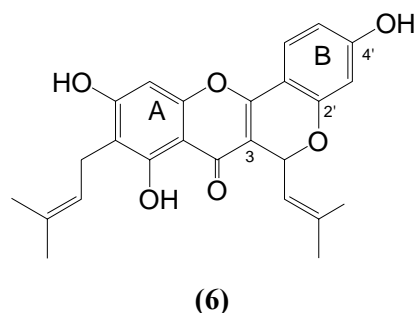
2',4'-Dioksigenasi piranoflavon

Selain itu, senyawa jenis piranoflavon yang mempunyai sistem 2',4'-dioksigenasi pada cincin B yaitu albanin A (5) telah diisolasi dari *A. champeden* dan siklokomunin (6) yang diperoleh dari *A. champeden* serta *A. altilis* (Achmad, 2005 ; Hakim, 2005). Senyawa 5 memperlihatkan sitotoksitas yang tinggi dengan nilai IC_{50} 2,3 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan senyawa 6 memberikan nilai IC_{50} 4,2 $\mu\text{g/mL}$. Satu senyawa aktif lain yaitu artelastin (7) yang dipisahkan dari *A. lanceifolius* memberikan nilai IC_{50} 5,8 $\mu\text{g/mL}$.

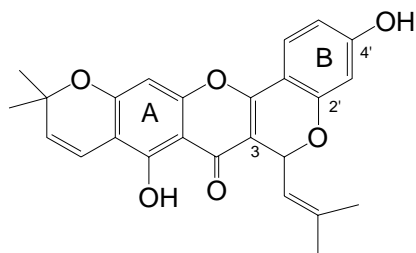


Bila dibandingkan dengan senyawa yang mempunyai substituen isoprenil yang bebas, seperti pada senyawa 5 yang mempunyai nilai

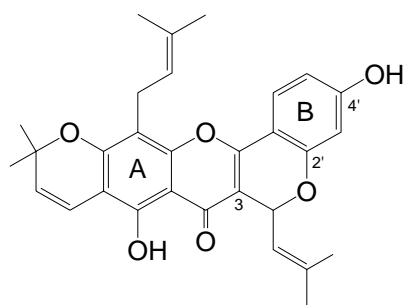
IC_{50} 9,0 $\mu\text{g/mL}$, aktivitas dari turunan 2',4'-dioksigenasi flavon yang meningkat, kemungkinan disebabkan oleh terbentuknya cincin piran antara gugus hidroksi pada C-2' dan gugus isoprenil yang terikat pada C-3, seperti tampak pada senyawa 6. Namun, aktivitas tersebut menjadi rendah seiring dengan tersubstitusinya gugus isoprenil pada cincin A, yaitu pada C-6 untuk pada senyawa 6, dan pada senyawa 7 yang mempunyai dua gugus isoprenil bebas yang terikat pada C-6 serta C-8.



Selanjutnya, dari kayu batang *A. altilis* ditemukan senyawa kudraflavon A (8) dan senyawa artelaskromen (9) dari kayu batang *A. lanceifolius* (Ersam, 2000 ; Hakim, 2005) yang merupakan 2',4'-dioksigenasi piranoflavon yang keduanya memiliki gugus 2,2-dimetil kromen yang terbentuk antara gugus hidroksi pada C-8 dan gugus isoprenil pada C-7. Senyawa 8 memperlihatkan aktivitas yang cukup tinggi dengan nilai IC_{50} 4,98 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan 7 hanya mempunyai aktivitas sedang (*moderate*) terhadap sel P388 dengan nilai IC_{50} 13,5 $\mu\text{g/mL}$. Adanya penurunan nilai IC_{50} dapat disarankan karena pada 9 terdapat gugus isoprenil bebas yang tersubstitusi pada C-8.



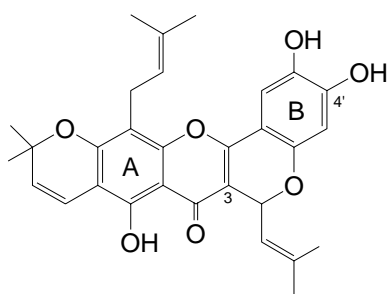
(8)



(9)

2',4',5'-Trioksigenasi piranoflavon

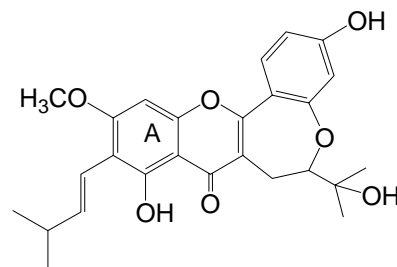
Kulit batang *A. champeden* ternyata juga mengandung sikloheterofilin (10) yaitu senyawa jenis piranoflavon lain yang memiliki gugus hidroksi pada C-2', C-4' dan C-5' (Achmad, 2005 ; Hakim, 2005). Senyawa 10 memberikan nilai IC_{50} 23,6 μ g/mL.



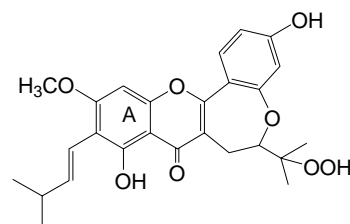
(10)

Oksepinoflavon

Senyawa jenis oksepinoflavon yang diisolasi dari *A. champeden* yaitu caplasin (11) dan senyawa baru artoindonesianin B (12) yang diperoleh dari *A. champeden* dan *A. altilis*. Keduanya memberikan aktivitas yang tinggi dengan nilai IC_{50} 2,0 dan 1,9 μ g/mg (Ersam, 2000 ; Achmad, 2005 ; Hakim, 2005), hal tersebut dapat disebabkan karena pada kedua senyawa mempunyai cincin oksepin, yang terbentuk antara gugus hidroksi pada C-2' dan isoprenil pada C-3'.



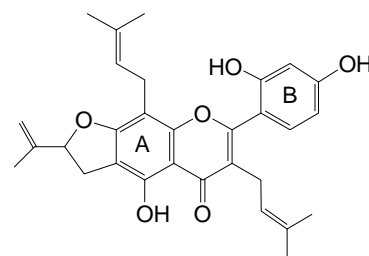
(11)



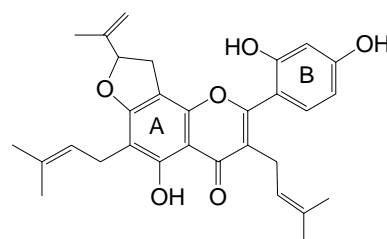
(12)

Dihidrofuran

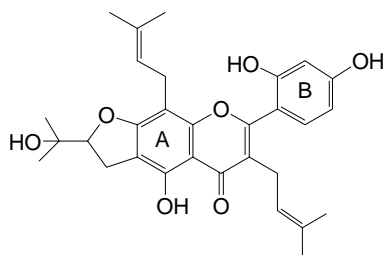
Senyawa baru jenis dihidrofuran diisolasi dari *A. lanceifolius*, yaitu artoindonesianin G (13), H (14) dan I (15) (Syah, 2001). Ketiganya pula memberikan sitotoksitas yang tinggi dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 0,7 ; 1,8 dan 1,8 μ g/mL. Dapat disarankan bahwa keaktifan tersebut karena adanya cincin dihidrofuran yang terbentuk gugus hidroksi pada C-7 dengan isoprenil pada C-6 atau C-8.



(13)



(14)



(15)

4. Kesimpulan

Dari tiga spesies *Artocarpus* yaitu *A. altilis*, *A. champeden*, dan *A. lanceifolius* telah diisolasi berbagai senyawa flavonoid jenis flavon yang bersifat sitotoksik terhadap sel murine leukemia P388 yang termasuk kelompok 2',4'-dioksigenasi flavon, 2',4'-dioksigenasi 3-prenilflavon, 2',4',5'-trioksigenasi 3-prenilflavon, 2',4'-dioksigenasi piranoflavon, 2',4',5'-trioksigenasi piranoflavon, oksepinoflavon, dan dihidrofuran. Beberapa diantara senyawa tersebut memiliki aktivitas yang sangat tinggi.

Aktivitas dari senyawa flavon tersebut dapat dipengaruhi oleh adanya gugus isoprenil terutama pada C-3, selain juga pada C-7 dan C-9 yang selanjutnya menyebabkan siklisasi membentuk cincin piran, cincin 2,2-dimetil kromen, cincin oksepin, dan cincin dihidrofuran.

Dengan ditemukan sejumlah senyawa yang bersifat sitotoksik pada genus *Artocarpus* tersebut, maka genus ini dapat menjadi sumber senyawa yang bersifat antitumor yang potensial.

5. Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada berbagai pihak antara lain kepada Dikti, Republik Indonesia atas bantuan dana proyek penelitian kepada Prof. Norio Aimi, Prof. Hiromitsu Takayama, Dr. Mariko Kitajima dari Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan, Prof. Emilio L. Ghisalberty, The University of Western Australia, Prof. Koichi Takeya, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Tokyo, Japan. Selain itu, terimakasih diucapkan pula kepada Herbarium Bogoriensis, Bogor, Indonesia.

6. Daftar Pustaka

Achmad, S. A., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin, D., and Syah, Y.M., (2001), Natural

Products for better understanding of Biodiversity: Flavonoids in Moraceae as A Case Study, *J. Kimia Andalas*, 6-11.

Achmad, S. A., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin, D., and Juliawaty, L.D., and Syah, Y.M., (2002), Discovery of Natural Products from Indonesian Tropical Rainforest Plants: Chemodiversity of *Artocarpus* (Moraceae), Bilge Sener (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, 91-99

Achmad, S.A., E.H. Hakim, L.D. Juliawaty, L. Makmur, and Y.M. Syah, (2005), Indonesian Rainforest Plants- Chemodiversity and Bioactivity, *Malaysian Journal of Science*, 24, 7-16.

Alley, MC., Scudiero, D.A., Monks et al., (1998), *Cancer Res.*, 48, 589.

Ersam, T., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., Hakim, E.H., Tamin, R., (2000), Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari *Artocarpus altilis*, *Seminar ITB-UKM IV*.

Ersam, T., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., Hakim, E.H., Tamin, R., (2000), Some Phenolic Compounds from *Artocarpus altilis*, *Proceeding of International Symposium on The Role of Chemistry in Industri and Environment*, 113-119.

Erwin, E.H. Hakim, S.A. Achmad, Y.M. Syah, N. Aimi, M. Kitajima, L. Makmur, D. Mujahidin, dan H. Takayama, (2001), Artoindonesianin-B Suatu Senyawa Yang Bersifat Sitotoksik Terhadap Sel Tumor P-388 Dari Tumbuhan *Artocarpus Altilis*, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.* (Indonesia), 1, 20 – 27

Hakim, E.H. Juliawaty, L.D., Syah, Y.M., Achmad, S.A. (2005), Molecular Diversity of *Artocarpus champeden* (Moraceae): A Species Endemic to Indonesia, *Molecular Diversity* (USA), 9, 149-158

Heyne, K. (1978), Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid II, Jakarta, Departemen Kehutanan

Jarret. F.M., (1959), Studies in *Artocarpus* and allied genera, III, A Revision of *Artocarpus* subgenus *Pseudojaca*, *J. Arnold Arber.*, 60, 1-298.

Jarret. F.M., (1960), Studies in *Artocarpus* and allied genera, IV, A Revision of *Artocarpus* subgenus *Pseudojaca*, *J. Arnold Arber.*, 61, 73-230.

Syah, Y. M., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Makmur, L., Mujahidin, D., (2001), Artoindonesianin G-I, three new isoprenylated flavones from *Artocarpus lanceifolius*, *Fitoterapi*, 72, 765-773

Syah, Y.M. Achmad, S.A., Ghisalberti, Hakim, E.H., Mujahidin, D., (2004), Two new cytotoxic isoprenylated flavones Artoindonesianin U and V,

**Lia Dewi Juliawaty, Euis Holisotan Hakim, Yana Maolana Syah,
Sjamsul Arifin Achmad dan Lukman Makmur**

from the heartwood of *Artocarpus chempeden*
Spreng (Moraceae), *Fitoterapia*, 75,134-140

Fruits and Nuts, Prosea Foundation, Bogor,
Indonesia, 50-71.

Verheij, E.W., and Coronel, R. E. (Eds.), (1992),
Plant Resources of South-East Asia, Vol. 2..., Edible



Structural Transformation in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ ($x = 0, 0.1, 0.25$) Perovskites

Lindarti Purwaningsih, and Ismunandar

Department of Chemistry, Institut Teknologi Bandung
 Jl. Ganesha 10 Bandung 40132
 e-mail: s199lin@mail.chem.itb.ac.id, ismu@chem.itb.ac.id

Abstract

New perovskite $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ were synthesized by solid-state reaction. The crystal symmetry changed from orthorhombic to tetragonal and then to cubic with increasing of Li composition in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ as was observed in the XRD pattern. Powder XRD pattern of the samples $x = 0$ were indexed in an orthorhombic system, $x = 0.1$ the crystal structure changes to the tetragonal system, and then all the lattice parameters a , b , c become equal at the composition $x = 0.25$. The lattice parameter contracts during lithium insertion due to the reducing of Nb-O interatomic distance.

Keywords: perovskite, $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$, XRD, crystal-structure

1. Introduction

Lithium niobate has been an attractive material for integrated optics because of its excellent electro-optical, acousto-optical and nonlinear optical properties. Rare earth doped materials have received a renewed attention because of the availability of a broad range of its use (such as fuel cells, gas sensors, batteries, and random access memory materials).^{i, ii}

Investigation of the relationship between structure and property is an important research field. From a structural point of view, if there is a two-dimensional channel or three-dimensional tunnel in the structure of a compound, then a rich diversity of uses can be obtained.

Lithium intercalation in A-site-deficient perovskite type oxide, $\text{La}_{1/3}\text{NbO}_3$ were considered for use as electrode material for the lithium ion battery.ⁱⁱⁱ Nakayama et al have recently investigated the electrochemical behavior associated with Li insertion into the solid solution $\text{Li}_y\text{La}_{(1-y)/3}\text{NbO}_3$ and concluded that the cell potential was strongly dependent on the arrangement of La^{3+} ions and Coulombic

interaction.^{iv}

Ilymer and Smith first described the crystal structure of pristine $\text{La}_{1/3}\text{NbO}_3$.^v La ions and vacancies at A-sites are ordered within alternate (001) planes doubling the c -parameter of the cubic perovskite-type cell and leading to a slightly distorted orthorhombic lattice with parameters $a \sim a_p$, $b \sim b_p$, $c \sim 2a_p$ (p refers to the cubic-perovskite unit cell) as we had reported.⁶

In this article, the structural transformation in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ perovskites were reported.

2. Experimental

Different compositions of the $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ ($x = 0, 0.1, 0.25$) solid solution were prepared by conventional solid-state reaction. The mixture of stoichiometric amounts of Li_2CO_3 (99.9%, Sigma-Aldrich), La_2O_3 (99.9%, Sigma-Aldrich), and Nb_2O_5 (99.9%, Sigma-Aldrich) was heated at 800°C for 24 hours. After that, the calcined powder was ground and heated at 900°C for 24 hours. These processes were repeated at higher temperatures (1000°C, 1100°C and 1200°C) for 24 hours each time.

X-ray diffraction was employed to characterize

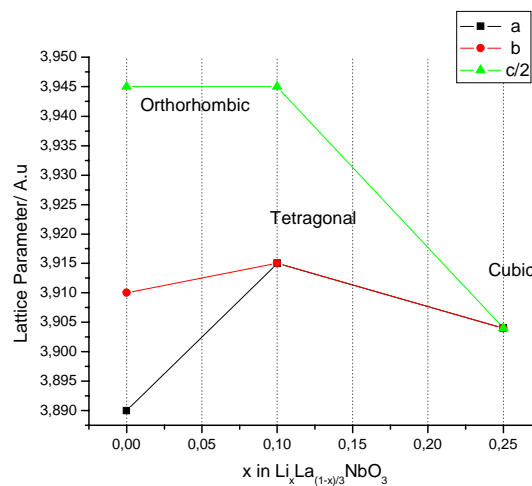


Fig. 1 Comparisons of parameter a, b, c in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ perovskites.

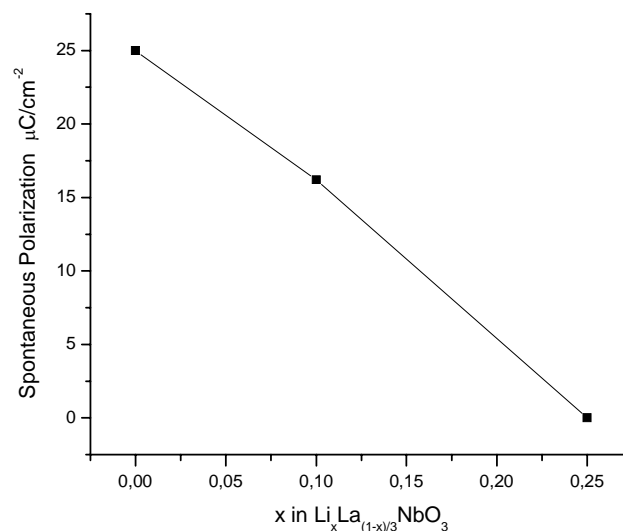


Fig. 2 spontaneous polarization curve versus composition x in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ perovskites.

the structure of the synthesized perovskite. The XRD patterns were taken with a Phillips Generator 1140/00 diffractometer with Cu-K α radiation. Morphology phase analysis and the lattice parameters refinement were carried out by Phasax and Proszki software with Powder Diffraction File (PDF) basis data. To determine ferroelectric properties of materials, RT-66A Ferroelectric System Radiant Technology were employed. The samples were pressed at 10 bar in order to obtain a homogenous pellet and heated at 200°C for 30 minutes, then electrically conducted with the RT-66A Radiant Technology equipment.

3. Results and Discussion

From the powder XRD patterns of $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$, there are structural changes in these perovskite parameter as shown in Fig. 1. $\text{La}_{0.33}\text{NbO}_3$ perovskites XRD pattern shows that all reflections were indexed as orthorhombic cell ($Pmmm$) with the stacking of two perovskite subcells along the c -axis or we called it double primitive cell. The parameter for the primitive unit cell was calculated as $a = 3.89(3)$ Å, $b = 3.91(1)$ Å, $c = 7.89(5)$ Å.

$\text{La}_{0.33}\text{NbO}_3$ perovskite has orthorhombic structure with the stacking along the c -axis. La^{3+} ions locate at the corner of the unit cell, while Nb and O atoms generate distorted octahedral to give two square planar in the

center of unit cell. There are two or three A-site vacancies exist in the structure. The ordering arrangement of vacancies provides a two-dimensional channel for lithium insertion and extraction.² That's why, this material was considered for use as electrode material for the lithium ion battery. Spontaneous polarization of this compound was calculated as $25 \mu\text{C}/\text{cm}^2$.

In second case, $\text{Li}_{0.1}\text{La}_{0.3}\text{NbO}_3$ has tetragonal perovskite structure with rearrangement of host lattice framework from $Pmmm$ to $P4/mmm$. The parameter cell was calculated as $a = b = 3.915(1) \text{ \AA}$, $c = 7.89(1) \text{ \AA}$. The NbO_6 octahedral lies in the center of unit cell, La^{3+} ions locate at the corner of it, and while Li^+ ions occupy the vacancies between La^{3+} ions. Lithium ions are small enough to insert in that site, which make the structure more compact. The more symmetric of this structure give smaller spontaneous polarization, $16.2 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. It is because Li^+ ion surrounding stabilizes NbO_6 octahedral.

The last perovskite, $\text{Li}_{0.25}\text{La}_{0.25}\text{NbO}_3$ has calculated cell parameter $a = b = c = 3.904(6) \text{ \AA}$ with cubic symmetry ($Pm-3m$). Cubic structure has higher symmetry; therefore dipole moments will be fading away. Hereinafter, $\text{Li}_{0.25}\text{La}_{0.25}\text{NbO}_3$ has no ferroelectric properties but paraelectric. Its spontaneous polarization is $0 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. The spontaneous polarization curve versus composition x in $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ shown in Fig. 2.

The conclusion from Fig.1 is consistent with the previous study by Nakayama. Its structural changes were triggered by complicated interatomic distance of its atoms. Through the

lanthanum insertion, the niobium-oxygen distance is decreasing which leading cell parameter contraction.

4. Conclusion

Cell parameters of $\text{Li}_x\text{La}_{(1-x)/3}\text{NbO}_3$ ($x = 0, 0.1, 0.25$) perovskites change from orthorhombic ($Pmmm$) to tetragonal ($P4/mmm$) and then to cubic ($Pm-3m$) with increasing the composition x , which drive down its ferroelectric properties. The spontaneous polarization (P_s) for $x = 0; 0.1; 0.25$ are $25 \mu\text{C}/\text{cm}^2$, $16.2 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ and $0 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ which mean the material lose its ferroelectric properties at the composition $x = 0.25$.

5. References

1. Nakayama, M., Imaki, K., Ikuta, H., Uchimoto, Y., Wakihara, M.; *J. Mater. Chem* 12, 2002, 1500.
2. Nakayama, M., Imaki, K., Ikuta, H., Uchimoto, Y., Wakihara, M., Ra, Wonkyung; *Chem. Mater*, 15, 2003, 1728-1733
3. Wang, G.X., Yao, P., Bradhurst, D. H Dou S.X., Liu, H.K.; *Solid State Ionics* 124 , 1999, 37-43.
4. Nakayama, M., Imaki, K., Ikuta, H., Uchimoto, Y., Wakihara, M.; *J. Phys.Chem. B*, 106, 2002, 6437-6441
5. Iyer P.N.; Smith, A. J. J. *Acta Crystallogr.*, 23, 1967, 740
6. Purwaningsih, L., Ismunandar; *Proceeding of National Seminar of Indonesian Chemical Society*, 2003

Total flows contribution of the Tasik Chini feeder rivers and its significant water level, Pahang, Malaysia

Muhammad Barzani Gasim, Mohd. Shuhaimi Othman and Tan Choon Chek

School of Environment and Natural Resource Sciences
Faculty Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor, Malaysia
e-mail: dr.zani@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Tasik Chini is located in the southeast region of Pahang, Malaysia. Humid tropical climate with two monsoon periods, characterized by bimodal pattern; southwest and northeast monsoons bring annual rainfall from 1488 to 3071 mm. The lake system lies at 3°15'40"N and 102°45'40" and comprises of 12 open water bodies. The lake area covers 202 ha of open water (permanently flooded area) and 700 ha of freshwater swamp and swamp forest, which is temporarily or seasonally inundated by water. However the open water area has expanded greatly since 1995, due to the increased retention of water after the construction of a barrage at Chini River. Disturbance of hydrological function was started in late 1995, when the water has damaging hectare of plants community, and then they cut it down the barrage to about 1.80 m lower in 1998. Chini River, which was the tributary of the Pahang River now become abandoned, only survived by seven river tributaries, such as Datang River in the Northeast, Gumum and Kura-Kura Rivers in the East, Perupok River in the west and Melai and two unnamed Rivers in the South. The lake is drained by a Chini River, which meanders for 4.8 km before it reaches Pahang River. Total flows of each feeder river was ranged from 0.004 to 0.08 m³/sec or 345 to 7,171 m³/day, while discharge of Chini River to Pahang River was 1.2 m³/sec or 103,680 m³/day and this contribution from five feeder rivers was far below the target to contribute water to the lake if the barrage being demolished. Some activities such as illegal logging, oil palm plantation, ecotourism, recreation forest and agriculture were taken part and consequently increase the sedimentation and that may shorten the living span of the Tasik Chini in the next future.

Keywords: *feeder river, total flows, barrage, inundated, sedimentation*

1. Introduction

Tasik Chini covers an area of 202 ha of open water and 700 ha of Riparian, Peat, Mountain and Lowland Dipterocarp forest (Wetlands International Asia Pacific, 1998). Under this study, the coverage of basin will enlarge into an area of 5,700 ha (57km²) in order to determine the characteristics of hydrological and drainage system of the basin. Instead of 902 ha of the Tasik Chini, 4,790 ha of the water catchment area in surrounding Tasik Chini is consider rich in biological source such as varieties of terrestrial flora and fauna. A study carried by Malaysian Nature Society (1999), found that Tasik Chini has 288 species of plants, 21

species of aquatic plants and 92 species of birds. Overall, compared to other lakes in Malaysia, Tasik Chini has the highest diversity of species (Jabatan Alam Sekitar, 1999). Natural resources based on Hyland (2003) can attract visitors, causing industry growth, but this is turn increases the amount of waste and resulting pollution, leading to deteriorated environmental quality, which then causes the number of tourists to decrease. Much of the degradation of freshwater ecosystem results from overexploitation, habitat destruction, pollution and the introduction of non-native species (UNEP, 2003).

Basin analysis such as morphometric studies may ultimately extend to show the influence of basin characteristics on channel cross sections and channel attributes. According to Horton cited by Strahler (1957), stream networks have a distinct fabric, called the drainage composition, in which the relationship between streams of different magnitude can be expressed in mathematical terms.

Strahler (1956) and Verstappen (1983) described, if drainage density value less than 5.00 its consider as coarse texture, common in resistant rock like sandstone or quartzite, between 5.00 and 13.7 as medium texture, and between 13.7 to 155.3 as fine texture, is common in soft rock like clay or hornfels. Bifurcation ratio (R_o) is defined as the ratio of the number of streams of a given order to the next higher order (using Strahler order). When the geology is reasonably homogeneous throughout a basin, R_o value usually ranges from 3.0 to 5.0 (Dale et al., 1978). The length ratio (R_L), similar in context to the bifurcation ratio, is the ratio of the average length of streams of a given order to those of the next higher order. The length ratio can be used to determine the average length of streams in an unmeasured given order (L_o) and their total length. A stream segment from Horton's method that was refined by Strahler (1952a) becomes the ordered units. Finally, Carlston (1963) introduced the application of the Jacob Model in order to relate the connection between morphometric (landform) and stream flow (hydrology) in form of regression relationship.

2. Experimental

Two series of topographical maps with scale of 1: 25000 were used to draw the characteristics of river basin morphometry of the Tasik Chini. The two series are consisting of: (a) Series L8010, Kg Belimbing, Sheet 90 d, and (b) Series L8010, Sungai Mentiga, Sheet 90s. The whole sub catchments of the Tasik Chini Watershed were redrawn on the tracing paper, to determine their morphometric characteristics. Velocity and flow pattern of every river were identified and measured with flow meter during field observation.

3. Results and Discussion

Morphometric characteristics of the basin that included of the seven feeder rivers, namely: 1) Sg. Gumum, 2) Sg. Melai, 3) Sg. Datang, two unnamed rivers 4) Sg.A and 5) Sg.B, 6) Sg.

Kura-kura and 7) Sg. Perupuk. Basin area of the seven feeder rivers are ranged from 0.26 to 6.313 km², Sg. Gumum has the largest sub basin and Sg. Kura-kura is the smallest. Total stream length and length of overland flow for the watershed is ranged from 0.08 to 22.93 km, Sg. Kura-kura is the shortest and Sg.B & Sg.Gumum are the longest. Drainage density and bifurcation ratio ranged from 3.08 to 5.77; Sg. Datang is the largest Dd while Sg. Perupuk is the largest Ro. Total area for the seven sub catchments of the Tasik Chini feeder rivers are 27.533 km² (Table 1).

Characteristics of the Tasik Chini Basin based on the morphometric variables show that: a) drainage density shows that surface characteristics of the Tasik Chini basin consist of coarse texture; infiltration rate is more dominant than surface runoff; b) scarcity of length of overland flow most of the river branches in the basin. All these criterions were indicated that insufficiency of water supply to the main river.

Stream flow discharge from each sub basin to the tasik is relatively low it is ranged from 0.018 to 0.083 m³/sec or average at 0.05 m³/sec. Daily discharge from each sub basin was ranged from 346 to 7,171 m³ or average at 4,258 m³/daily Sg. Gumum is the largest sub basin as well as largest stream flow in the basin, and Sg. Kura-kura was the lowest. Total stream flow for the basin area (27.533 km²) is 0.345 m³/sec or 29.808 m³/day (Table 2).

Total area of the Tasik Chini Basin under this study is 57.00 km², consist of 27.533 km² sub basins that occupied by seven feeder rivers, 20.447 km² of small and scattered sub basins and 9.02 km² catchments for the lake area (Figure 1).

Total flow from seven feeders rivers is 0.345 m³/sec, while total flow from another small sub basins based on the stream flow calculation only 0.271 m³/sec. If we consider that all the sub catchments could contribute water accordingly to the tasik and make the total flow to Tasik Chini become 0.616 m³/sec or 53,222 m³/day. If the average depth of the Tasik Chini is 1.6 m, volume of the lake can be calculated as 2.02 (10000) x 1.6 x 1m³ = 32,320 m³. There are few small islands in the lake, P. Balai for example (± 0.5 km²). Calculation of the total

volume of the lake will be different and the volume of tasik should be less than 32,320 m³.

In this calculation show that total volume of the Tasik Chini (32,320 m³) is less than total flow that was contributed by feeder rivers and small sub catchments (53,222 m³/day), there are may be another retention of water contribution from certain sub catchments such as dried source that does not contribute water to the lake; for example Sg. Datang catchment, was identified as a stagnant water, high Evapotranspiration of the tasik may be another factor.

There is another source that may come from ground water contribution. Water contribution as base flow recharge to Tasik Chini was came from infiltration process after precipitation being intercept by tress in the forest areas. The calculation can be formulated as follows:

$$P = Q_s + R + ET,$$

where:

P = Precipitation; Q_s = Surface runoff; ET= Evapotranspiration; R = Recharge (Infiltration).

4. Conclusion

Stream flow from Chini River to Pahang River during the normal period (May) was 1.2 m³/sec or 103,680 m³/day. Water input to fulfill water requirement in order to maintain sustainable of the Tasik Chini is far below the target, its only 0.616 m³/sec or 53,222 m³/day. There are unbalance discharge between water input from the seven feeder river and small sub basins and water output to the Pahang River, the difference most probably was supported by ground water discharge either as base flow or through flow origin. Once Tasik Chini is depend on ground water supply through base flow process; logging activity in surrounding area of the basin should be observed and monitors in order to maintain level of the tasik.

5. Acknowledgment

This study was conducted and supported by Government grand (IRPA: 02-02-09-0117-EA294).

6. References

Carlston, C.W. 1963. Drainage density and stream flow. In Stanley A. Schumm. (Ed.) *Drainage basin morphology*. P. 181-188

Dale F. R., Kochel R. C. & Miller. J. R. 1978. *Process of geomorphology*. Wm.C.Brown Communications, Inc. All. United States. P.136-190.

Hyland, E.M. 2003. The potential for private sector partnerships to protect marine/coastal areas through national action programmes. *Industry and environment* 27 (1). P. 25-28

Jabatan Alam Sekitar (JAS). 1999. *Pencemaran Air. Mengenai bumi kita*. Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar, Kuala Lumpur.

Malaysian Nature Society. 1999. *A Survey of vegetation and avifauna of Chini*. Malaysia Nature Society.

Strahler, A. N. 1952a: Hypsometric (area altitude) analysis of erosional topography. *Geological Society American Bulletin*. 63 : P.1117 - 1142

Strahler, A. N.1957: Quantitative analysis of watersheds geomorphology. *Trans. Americans Geophysics Union*. 38 : P.913 – 920

Verstappen, H.Th. 1983. *Applied geomorphology. Geomorphological Surveys for Environmental Development*. Elsevier, Amsterdam.

United Nation Environment Programme (UNEP) 2003. *Freshwater: meeting our goals, sustaining our future. The Geo Section Division of Early Warning and Assessment (DEWA), UNEP*. P. 36-53

Wetlands International Asia – Pacific. 1998. *The ecological assessment of Tasik Chini, Pahang, Peninsular Malaysia: an evaluation of its conservation value and environmental improvement requirements*. Kuala Lumpur.

Table 1: Morphometrical characteristics of the Tasik Chini Watershed

No.	River	Basin Area (km ²)	Total Stream Length (km)	Drainage Density (Dd)	Stream Frequency (F)	Length of Overland Flow (km)	Bifurcation ratio (R _o)
1	Sg. Gumum	6.313	19.450	3.0812	6.3367	0.1623	3.5515
2	Sg. Melai	2.778	12.075	4.3474	9.3609	0.1150	4.2075
3	Sg. Datang	3.613	18.500	5.1211	15.7785	0.0976	4.4017
4	Sg. A	4.963	22.925	4.6196	13.5013	0.1082	4.2841
5	Sg. B	5.808	20.600	3.5471	8.0930	0.1410	3.6100
6	Sg. Kura-kura	0.26	1.500	5.7692	19.2308	0.0867	3.5000
7	Sg. Perupuk	3.798	18.025	4.7465	17.1165	0.1053	4.6324
	Total	27.533					

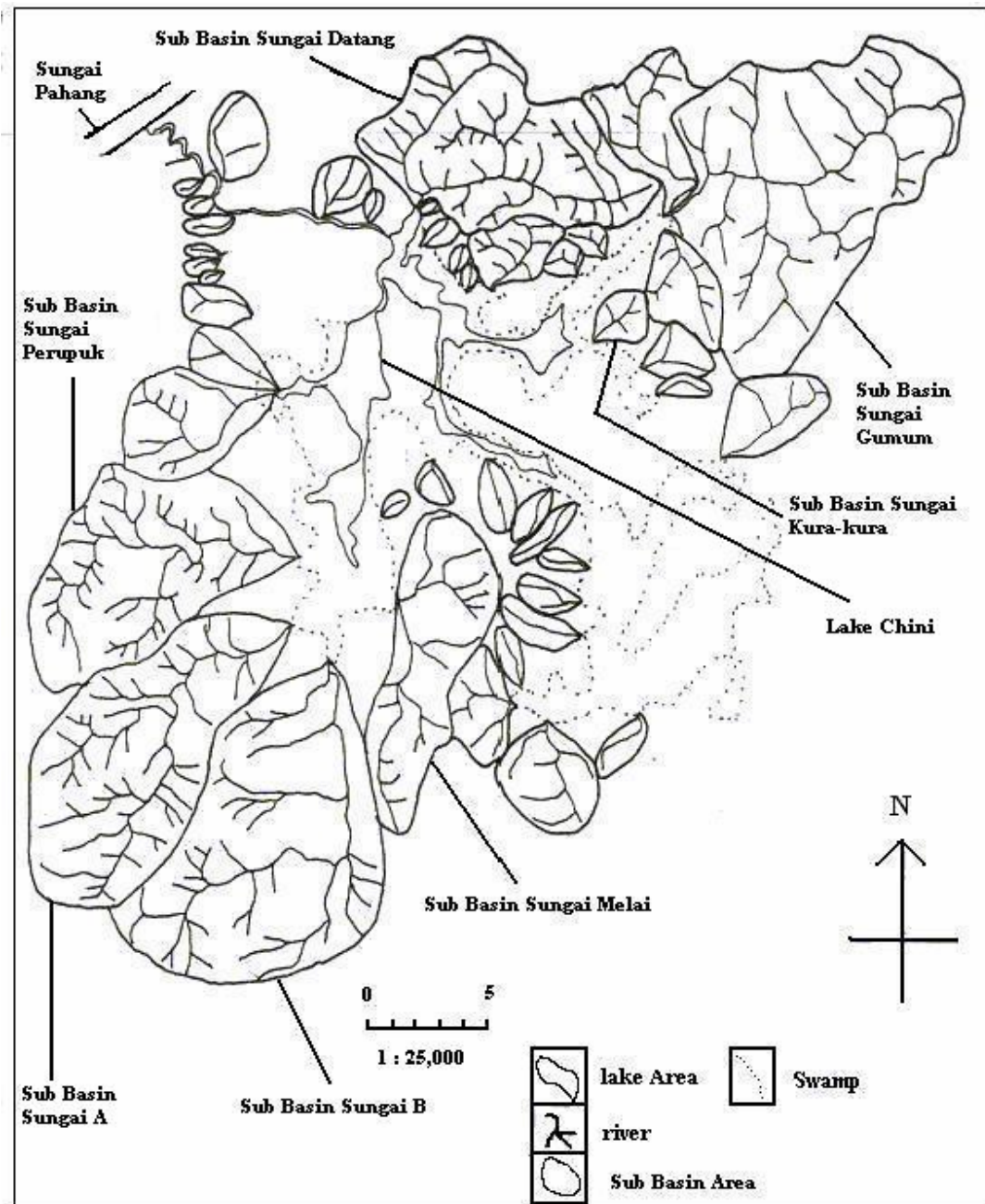


Figure1: Distribution of sub basins in the Tasik Chini Basin

Table 2: Total flow contribution from 7 feeder rivers into Tasik Chini

No.	Feeder River	Basin Area (km ²)	Stream flow (m ³ /sec)	Stream flow (m ³ /day)
1	Sg.Datang	3.613	0.047	4,060
2	Sg.Perupuk	3.798	0.052	4,493
3	Sg.Melai	2.778	0.018	1,555
4	Sg.Kura-kura	0.26	0.004	346
5	Sg.Gumum	6.313	0.083	7,171
6	Sg.A	4.963	0.065	5,616
7	Sg.B	5.808	0.076	6,566
	Total	27.533	0.345	29.808



Penyediaan Tipisan Nipis Elektrokromik Titanium Dioksida (TiO₂) Menggunakan Kaedah Sol Gel

Mansor Abdul Hamid¹⁾, Ismail Ab. Rahman²⁾

1) SIRIM Berhad, Lot 34, Jalan Hi-Tech 2/3, 09000 Kulim, Kedah, Malaysia, e-mail: mansor@sirim.my

2) Pusat Pengajian Sains Kimia, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, 11800, Malaysia

Abstrak

Tipisan nipis TiO₂ boleh terhasil daripada celupan substrat kaca yang disalut dengan Indium-Timah Oksida (ITO) ke dalam larutan sol gel yang mengandungi campuran logam alkoksida titanium isopropoksida sebagai bahan pemula, etanol sebagai pelarut dan asid asetik sebagai bahan penstabil. Analisis menggunakan Mikroskop Daya Atom (AFM) menunjukkan bahawa tipisan nipis TiO₂ adalah seragam dan saiz butiran adalah nano-kristal. Kekesatan tipisan nipis ini adalah dibawah 5 nm dan ini mengesahkan tipisan nipis ini adalah seragam. Difraktogram pembelauan sinar-X (XRD) yang dijalankan juga menunjukkan kehadiran fasa anatase tipisan nipis TiO₂ yang dipanaskan pada suhu 400°C hingga 650°C selama 1 jam. Ujian voltametri berkitar (CV) menunjukkan kehadiran sifat-sifat elektrokromik tipisan nipis di dalam larutan LiCl₄ + PC, dengan keadaan tanpa warna kepada kelabu.

Paper is not available

Profil Konsentrasi Oxygen Axial Dalam Air Pada Kolom Gelembung Bersekat Vertikal Secara Eksperimen dan Simulasi

Margono, Hary, Dicky, Basuky S, Revan A

Lab. Perpindahan Panas dan Massa
Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS
Kampus ITS Keputih-Sukolilo, Surabaya 60111
Telp. 5947118 Fax 5999282
E-mail : kristanti@indo.net.id

Abstrak

Kolom gelembung adalah tempat terjadinya proses perpindahan massa, dimana gas akan berkontak dengan liquida. Gas akan terdispersi ke dalam phase liquida yang kontinu dalam bentuk gelembung. Tingkat perpindahan massa dalam kondisi tertentu akan menentukan lajunya dimana seluruh proses terjadi. Dalam proses ini dapat terjadi laju perpindahan massa yang tinggi yaitu dengan memperbesar luas interfacial dan tingkat intensitas turbulensi yang tinggi. Diantara peneliti-peneliti sebelumnya antara lain telah menggunakan model dengan anggapan bahwa dispersi axial lebih dominan daripada konveksi axial, karena liquidnya dalam keadaan stagnan. Pengembangan model telah dilakukan dalam penelitian ini untuk memprediksi profil konsentrasi oxygen terlarut secara axial dan steady-state dalam sebuah kolom gelembung bersekat dan vertikal, dengan laju alir dan udara secara counter-current. Jika profil konsentrasi oxygen hanya dipengaruhi oleh tekanan hidrostatik saja, maka akan terbentuk profil linier; jika terdapat pengaruh pengadukan maka profilnya menjadi non-linier. Beberapa faktor yang mempengaruhi profil konsentrasi oxygen antara lain, koefisien perpindahan massa gas-liquid volumetric overall, laju liquida dan laju gas dalam kolom. Pengaruh dari kenaikan variabel di atas terhadap profil konsentrasi adalah tidak begitu besar karena kenaikan variabel tersebut dipengaruhi oleh laju alir gas dan laju alir liquida yang harganya relatif kecil kalau dibandingkan dengan adanya pengaruh pengadukan. Sedangkan dalam penelitian ini dilengkapi dengan sekat yang berfungsi sebagai pengaduk. Dengan adanya sekat ini maka profil konsentrasi akan berbentuk non-linier. Dengan menimbulkan bentuk-bentuk tak berdimensi maka konsentrasi oksigen terlarut dapat dihitung secara analitis. Model yang dikembangkan meninjau aliran bulk, dimana terjadinya perpindahan massa ke arah axial karena pengaruh aliran konveksi, dan perpindahan massa melalui lapisan film yang mengelilingi gelembung dengan kondisi steady-state. Sedangkan model yang lain, selain variabel-variabel di atas juga akan ditinjau pengaruh dari dispersi radial. Dari sini akan dapat diturunkan suatu persamaan differensial, yang dapat mewakili peristiwa di atas. Dengan memakai beberapa kondisi batas yang diperlukan maka persamaan ini dapat diselesaikan. Dalam penelitian ini juga dilakukan secara eksperimen. Hasil simulasi akan dibandingkan dengan hasil eksperimen, dan juga dibandingkan dengan hasil peneliti-peneliti sebelumnya.

Paper is not available



NMR Studies on the Binding of Methylene Blue – Oligonucleotide Conjugates to Double-Stranded DNA

Maria Goretti Marianti Purwanto¹⁾, K. Weisz²⁾

1) Departemen Kimia, Universitas Surabaya, Raya Kali Rungkut, Surabaya 60292, Indonesia,
e-mail: maria_gmp@ubaya.ac.id

2) Institut für Chemie und Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Soldmannstrasse 16, Greifswald, D-17489, Germany, e-mail: weisz@uni-greifswald.de

Abstract

The dye methylene blue (MB) was covalently attached to a third strand oligonucleotide and its binding to double-stranded DNA was investigated by NMR methods. MB is able to produce singlet oxygen upon irradiation which in turn may cleave DNA strands at specific sites. This offers a significant potential of MB to act as an artificial nuclease and may find its application in many human therapy methods. Up to now, structural details of the dye binding could only be indirectly deduced from linear and circular dichroism studies as well as from theoretical calculations. In order to specify the preferred binding mode, we have synthesized MB with a suitable linker for subsequent attachment to an amino-modified DNA oligonucleotide. The resulting oligonucleotide-dye conjugate was subjected to several complementary DNA double helices and formed triple helices were characterized by NMR spectroscopic methods. The predominant binding mode was explored by performing a series of one- and two-dimensional homo- and heteronuclear NMR experiments in aqueous solution, in some cases also employing specifically ¹⁵N-labeled cytosine nucleosides at the potential binding site.

Paper is not available

Peat Adsorbents Prepared with Natural Rubber Latex As Filter Media For The Treatment Of Domestic Wastewater

M.A. Nawi¹, S.S.Chow and M.Z. Ibrahim

School Of Chemical Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800, Minden, Penang,
West Malaysia

e-mail: mohdasrinawi@yahoo.com

Abstract

Temperate peat soil has been proven to be useful as a filter medium for treating domestic wastewater. However, no works has been done to convert tropical peat soil into a filter media for wastewater treatment. This is due to the intrinsic nature of tropical peat soil which leaches heavily, have poor hydraulic conductivities and acidic nature. This paper relates to our work in converting tropical peat soil into a functional filter media for domestic wastewater treatment. Thus, tropical peat soils with severe leaching problems and poor hydraulic conductivities was converted into a functional filter media via heat treatment at 500 °C for 3 hours and further pelletized with natural rubber latex. Adsorption isotherms analysis showed that the uptake of COD by peat-rubber pellets followed both Langmuir and Freundlich models. Thermally treated peat-rubber pellets had improved hydraulic conductivities, neutral pH and minimal organic leaching. Sustainable removal of COD from molasses solution was achieved upon its repeated usage. This self-regenerating characteristics was proven to be due to the better growth of bacteria on the surface of the adsorbent. This filter system was used to treat domestic wastewater and its performance was followed for up to three months. Up to 3000 L of wastewater was treated using the filter system without any significant breakthrough level. This filter system was able to remove COD, BOD, turbidity, suspended solid, colour, NH₃-N, org-N, PO₄-P, Cu and Zn with level of removal at 75.2%, 96.7%, 76.9%, 78.9%, 75.0%, 74.5%, 51.2%, 96.8%, 48.7% and 33.3% respectively.

Key words - Tropical peat, thermal treatment, molasses, natural rubber, peat pellets, self-regeneration.

1. Introduction

Peat soil from temperate countries has been proven to be an efficient medium for wastewater treatment (Viraraghavan & Ayyaswami, 1987; McLellan & Rock, 1986; Couillard, 1994; Nichols, 2000; Archand, 2000). However, conversion of tropical peat soils into filter media for wastewater treatments needs pretreatment due to several intrinsic problems such as low chemical stability and mechanical strength, leach of fulvic and humic acids from peat, low hydraulic conductivity and difficult regeneration. The success of converting tropical peat soils into filter media for wastewater treatments will depend on solving those mentioned problems. M.A. Nawi *et al* (2004) had described a thermal treatment process of some Malaysian peat soil for

improved adsorption properties. Besides improved properties, thermal treatment of peat increased its wettability and reduced its leaching problem.

This work describes the conversion of tropical peat soil into adsorbents for application as filter media to treat domestic wastewater. Highly improved hydraulic conductivity and very minimal leaching problems were achieved via agglomerating thermally treated peat powders with natural rubber latex. This method also provides self-regenerating mechanism of peat adsorbents via improved biological growth on the agglomerated peat.

2. Percobaan

Peat samples and reagents

Peat samples were obtained from two locations namely from Gunung Jerai (GJ) in the northern region of West Malaysia at a depth of 0.5 m and another peat was sampled from Batu Pahat (BP) located in the southern region of West Malaysia also at a similar depth. Both peats were air dried and ground into powder via a mechanical grinder. No attempt was made to separate peat particles into different sizes.

High ammonia grade latex (Centrifuge Latex 60 % DRC) was purchased from *Kedahtex*. Cibacron Brilliant Red B (RR12), C.I. 18156 textiles dye was obtained from Ciba-Geigy and BASF(M) Sdn. Bhd. respectively. Molasses waste was obtained from Malayan Sugar, a sugar processing factory located in Seberang Prai, Malaysia. Other chemicals were of analytical grades obtained from either R&M Chemical, BDH Chemicals, Merck, Riedel-de Haen, Fluka or Unilab Chemical.

Analysis of physical characteristics of peat soil

Various analysis for physical characterization of peat soil involved the methods of Papp and Harms (1985), ASTM method (ASTM,1971), Heikkinen et al (1995), Stevenson, F.J., (1994) Walmsley (1977) and HACH procedures (HACH, 1992).

Preparation of peat pellets

Thermal treatment was done according to the method of M.A.Nawi *et al* (2004). Natural rubber latex with weights ranging from 0.05 – 0.3 gram were each placed in their respective 100 ml beakers. To each beaker was added 4 mL of distilled water and the mixture was properly mixed until each becomes a homogeneous emulsion. To each of these emulsions was added 2.0 g thermally treated peat sample. Mixing of rubber latex and treated peat samples were done manually with spatula until small pellets of about uniform size was obtained. The peat-rubber pellets were then soaked in 10% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution for about 30 minutes. Finally, the pellets were cleaned by washing generously with tap water and stored without drying in a closed container prior to use.

Adsorption studies

The adsorption studies were conducted by shaking the peat samples with either dye, molasses or domestic wastewater solutions by using the wrist action shaker SF1 (Stuart Scientific). A plot of the uptake of each dye or COD against contact times should reveal the

equilibrium time required for each impurities solution. The measurement of the uptake of each dye by each peat sample was done spectrophotometrically. A similar experiment was done for domestic wastewater whereby COD uptake was monitored. The adsorption data was plotted according to the linearized Freundlich and Langmuir equations to obtain the characteristics of the COD adsorption.

Self-regeneration capability of peat samples.

Samples of 2.0 gram each from both thermally treated peat and peat-rubber pellets were each shaken with 25.0 mL of molasses solution with initial COD of 270 mg/L at 350 osc/min in 125 mL conical flasks covered with parafilm for 8 hours. A blank sample containing only 25.0 mL molasses solution with similar concentration was also prepared and shaken in the same manner. Each solution was then filtered using Whatman no. 42 filter paper their respective COD were determined. The filtered soil was kept moist and used for the second time using similar conditions. This process was repeated with new batches of molasses solution up to 8 times of repeated usage.

Fabrication of peat pellets filter units.

Filter system was fabricated from perspex plastic with dimensions of 14.5 cm x 14.5 cm x 80 cm. The filter set up has an open inlet with overflow outlet and effluent outlet placed at 5cm from the bottom of the filter column. The filter column was first filled up with fine gravel (10 cm height) to be followed with coarse sand for another 20 cm. It was then filled up with peat pellets up to 90 cm height (requires about 300 grams of peat pellets). On top of this peat pellets column was placed a 3 cm layer of coarse sand to ensure that no peat pellets floating within the incoming wastewater. Wastewater was pumped up into the upper part of the filter column and percolates through the filter media via gravity flow and out through the outlet at the bottom of the filter column.

3. Results and Discussion

Table 1 provides physical characteristics of Malaysia peat soils from Gunung Jerai and Batu Pahat. As indicated by Table 1, Malaysian raw peat soils could not be used directly as filter medium for treating wastewater as normally done with their temperate counterparts. There were four basic problems associated with Malaysian raw peat soils namely severe COD and color leaching, low hydraulic conductivity, poor

adsorption of dissolved organic matter (low surface areas) and low pH.

For RR12, there was a steady decrease in uptake of dye with increasing weight of added rubber.

Table 1: Physical characteristics of Malaysian raw and thermally treated peat soils from Gunung Jerai and Batu Pahat.

Parameters	Raw GJ	Heat treated GJ	Raw BP	Heat treated BP
pH	4.36	6.50	3.38	6.70
Ash, wt%	33.6	-	11.0	-
Organic, wt %	65.3	-	86.7	-
CEC (meq/100g)	104	0.88	143	0.06
Color Leaching (Hazen unit)	68	2.5	102	2.5
COD leaching,mg/L	24	5	69	2
BET Surface area, m ² /g	4.39	19.87	0.63	2.54
Average Pore Diameter, Å	193.48	51.1	214.34	92.12
Hydraulic conductivity, cm/sec	1.30 x 10 ⁻³	1.65 x 10 ⁻³	3.8 x 10 ⁻⁴	4.5 x 10 ⁻⁴
Langmuir monolayer capacity, Q ₀ , (for RR12), mg/g	4.45	8.00	0.45	1.62

Thun *et al* (1983) had demonstrated that thermally treated peat increased peat's mechanical strength making peat filtration beds less susceptible to clogging. In line with their work, we had subjected Malaysia raw peat soils with simple thermal treatments in anticipation of improved physical characteristics that may allow it to be used as filter media for wastewater treatment (M.A.Nawi et al, 2004). As shown in Table 1, thermal treatment of peat at optimized heating temperature of 500 °C for 3 hours in a muffled furnace reduced peat leaching problems, remove their acidic nature and improved their adsorption capacities. However, thermal treatment did not improve hydraulic conductivities of peat.

In order to increase the rate of filtration and to render its eventual usefulness as a filter bed medium, the treated peat needs to be pelletized. Among the various binders tested for this purpose; natural Malaysian rubber latex produced the best results. The choice of natural rubber latex is further augmented by its easy availability locally and its relatively cheap costs.

Optimization study of the ratio of latex to thermally treated peat was done by monitoring the removal of COD by pelletized peat samples from a diluted molasses wastewater sample using contact time of 8 hours. The optimum ratio of rubber to thermally treated peat was 0.20 g latex per 2 g. thermally treated peat. Amounts lower or higher than this range produces lower COD removal values. This behaviour was not observed with non-biodegradable impurities such as textile dye (Cibacron brilliant red B or RR12).

This phenomenon is expected since each additional rubber additive would increase the shielding effect of the peat surface thus reducing the effectiveness of surface adsorption of the dye molecules. Since the difference was due to the biodegradability of molasses samples, peat pellets was functioning via both adsorbents and biodegradation.

A time-equilibrium study of the removal of COD and RR12 dye by the peat-rubber pellets revealed that the time equilibrium for domestic wastewater was achieved within 40 minutes, molasses waste was at 60 minutes and for RR12 was at 40 minutes. The differences in time equilibrium was due to the different nature of chemicals adsorbed by pelletized treated peat. For comparison, thermally treated peat without latex produce a time equilibrium of 10 minutes with RR12 (M.A.Nawi et al, 2004). Thus the coating of rubber onto peat have slowed down the diffusion of molecules into the adsorbents surfaces. It was also observed that extended contact time produced two more equilibriums with successive increments of uptake for molasses waste while one more time equilibrium for domestic wastewater. This phenomenon was not observed for RR12. This observation was due to the effect of biological activities after extended contact time it did not occur with non-biodegradable dye.

Adsorption isotherms studies were done to determine the adsorption characteristics of rubber-peat pellets. For this purpose, only thermally treated Gunung Jerai peat samples were selected for pelletization. This selection

Table 2: Langmuir and Freundlich parameters of adsorption by rubber-latex peat pellets prepared from thermally treated Gunung Jerai peat. (a) Langmuir isotherms and (b) Freundlich isotherms

a. Langmuir Isotherm

Types of samples	Monolayer capacity, Q_0 (mg/g)	Langmuir constant, b (L/g)	Correlation factor
Domestic wastewater	3.428	0.015	0.9786
Molasses	14.99	0.002	0.9955
Textile dyes(RR12)	10.471	0.385	0.9979

b. Freundlich Isotherm

Types of samples	Constant, $1/n$	Constant, K (L/g)	Correlation coefficient
Domestic wastewater	0.0254	1.336	0.9864
Molasses	0.0309	0.157	0.9939
Textile dyes(RR12)	0.0072	2.89	0.9662

was based on its higher adsorption capacity as compared to Batu Pahat peat (see Table 1). For molasses waste, all peat peat samples were shaken for 5 hours in order to correlate with the first plateau obtained in previous time equilibrium studies. The data were then fitted into linearized equations of both Langmuir and Freundlich and the results are given in Table 2. Modes of adsorption fit both Langmuir and Freundlich as shown by the respective correlations values. The thermally modified peat-latex pellets had a Langmuir monolayer (Q_0) of 14.993 mg/g for molasses and 3.428 mg/g for domestic wastewater. This value was not significantly different from Q_0 of 15.20 mg/g molasses adsorption for un-pelletized thermally treated peat. Therefore, pelletizing peat with natural rubber did not give the undesirable effect of adsorption reduction as usually expected. A low $1/n$ value obtained for each case would mean that it is more suitable as a filter medium rather than as a batch-mode medium.

In order to investigate the possibility of biological activities that may influence the removal capacity of dissolved organics by peat pellets, a study was done on the repeated usage of the same rubber coated peat pellets with different fresh batches of molasses and domestic wastewater samples. In this study, each solution was shaken with respective peat samples for up to 8 hours. The choice of using extended contact time was to correlate with the second plateau of the time equilibrium curve. As speculated above, biological activity was another important mechanism of COD removal besides surface adsorption. The combination of these two mechanisms means that the adsorbed biodegradable organic molecules may undergo

biological degradation thus cleaning up surface of the adsorbent for further uptake of the next batch of pollutants. As shown in Figure 1, the percent removal of COD by the rubber coated peat pellets did not decrease upon repeated usage with fresh new batches of molasses solutions. Instead, the uptake increased at second usage and was more or less maintained for the entire duration of repeated usage. On the other hand, thermally treated peat without rubber showed a decrease in uptake at the second usage and was maintained through out at a much lower percent removal of COD. When peat pellets were used for a similar repeated treatments of non-biodegradable textile dye, (RR12, curve c), it experienced uptake reduction that eventually reached values close to zero after the fifth exposure. The result for RR12 dye was expected since it is non-biodegradable. Therefore for non-biodegradable substances, each repeated exposure would have a continuous reduction in the adsorption capacity of the peat pellets as such that after the fifth exposure it became completely exhausted. However molasses were biodegradable in nature. The maintenance of uptake with no apparent saturation point suggests the existence of bioactivity that help to clean-up the adsorption sites for incoming new pollutants.

The role of biodegradation mechanism occurring on the surface of peat pellets is supported further by the evidence that significant reduction of COD removal occurred when either of the molasses solution or peat pellets were sterilized. It can be seen from Figure 3 that when both molasses solution and peat rubber pellets were sterilized, very poor COD removal occurred especially upon repeated usage. Better results were

obtained when either one of them was not sterilized. The best result was obtained when both molasses solution and peat pellets were not sterilized.

This is a very clear evidence that the increasing number of bacteria counts on the adsorbent surface was responsible for the improved uptake of COD by peat pellets upon its continued

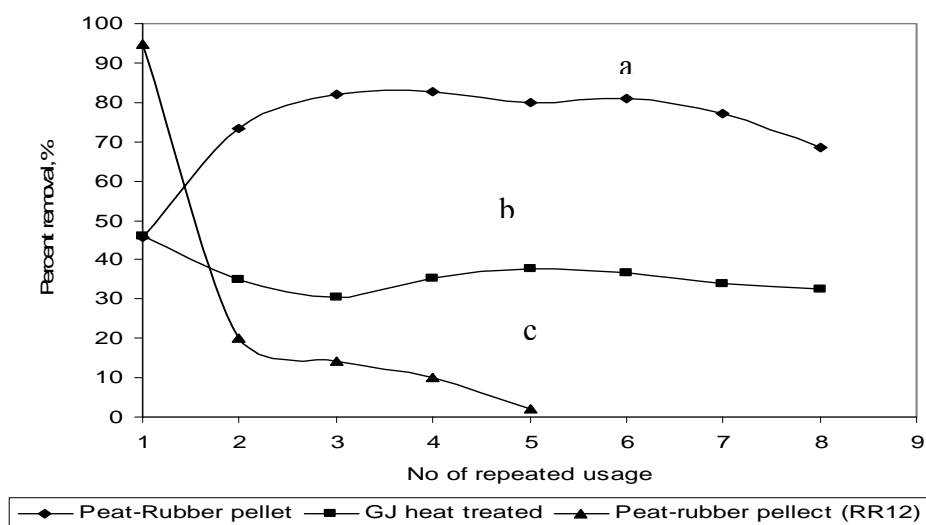


Figure 2 : Plots of percent removal uptake of COD upon repeated usage of (a) peat-rubber pellets on molasses solution (b) thermally treated peat on molasses solution and (c) peat-rubber pellets on non-biodegradable textile dye reactive red 12 (RR12)

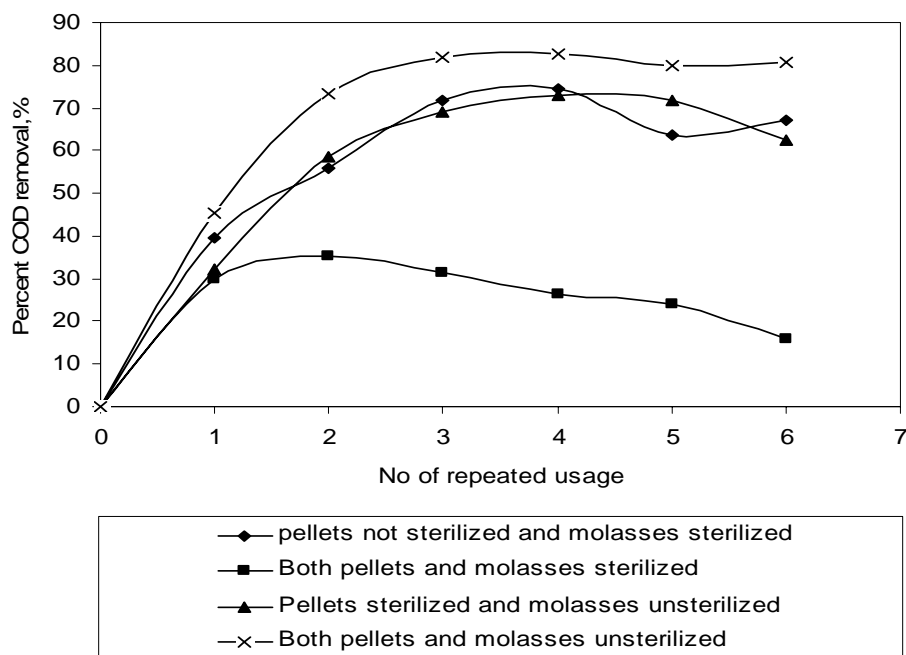


Figure 3: The effect of sterilization on either peat-rubber pellets or molasses solution or both on the efficiency of COD removal upon repeated usage of peat-rubber pellets

An experiment was further done to count bacteria growth within thermally treated peat and pelletized thermally treated peat by using molasses wastewater system. It was found that the presence of rubber improved the bacteria counts. In addition, bacteria growth was found to increase with repeated usage of the peat pellets.

repeated usage. However, thermally treated peat without rubber generally was one fold smaller in terms of total number of bacteria. The results of this experiment provided a clear explanation for the observed sustainable uptake of COD from molasses upon repeated usage of the adsorbents. The presence of rubber had induced higher

bacteria activities that helped the adsorbent to be self-regenerative. The possible role of rubber here was to provide attachment sites for bacteria growth. The raw natural rubber is a macromolecular isoprenoid. Non rubber constituents may includes proteins, lipids, carbohydrates, resins and inorganic salts. The presence of these constituents may help in the promotion of rapid bacteria growth on the surface

pellets filter system is summarized in Table 4 below.

4. Conclusion

Tropical peat soils with severe leaching problems and poor hydraulic conductivities can be converted into a decent filter media via simple thermal treatment. This thermally treated peat has been shown to have minimal leaching

Table 4: Water quality characteristics of domestic wastewater (influent) and treated wastewater (effluent) by peat pellets filter system. Flow rate was maintained at 100 mL/min.

Water Quality Parameters	Influent	Effluent	Percent removal (%)
COD, mg/L	101	25	75.2
BOD ₅ , mg/L	60	2	96.7
Kekeruhan, FTU	52	12	76.9
Pepejal terampai, mg/L	38	8	78.9
Warna, unit Hazen	60	15	75.0
pH	7.55	7.22	-
Oksigen terlarut, mg/L	0.76	2.58	-
NH ₃ -N, mg/L	19.4	4.9	74.5
NO _x -N, mg/L	0.18	0.26	-44.4
Organik-N, mg/L	4.10	2.00	51.2
PO ₄ -P, mg/L	3.13	0.10	96.8

of the peat pellets. In fact the introduction of rubber into the peat system has increased bacteria growth by up to 100 times.

Evaluation of hydraulic conductivities of peat-rubber pellets gave a value of 0.227 cm/sec. This is about 174 times better than raw peat soil. In addition, the system also provides a very low peat soil leaching (M.A.Nawi et al, 2004) and improved hydraulic conductivities. We therefore had converted raw tropical peat soil into a suitable filter media for wastewater treatment. The filter system that was set up was a laboratory scale filter unit fabricated using a 300g peat pellets layered above sand and fine gravels in a perspex container. Essentially no breakthrough point was observed over the entire application of peat pellets filter in the treatment of domestic wastewater. The overall performance of peat

problems and improved adsorption capacity (M.A.Nawi et al, 2004). Pelletization of this thermally treated peat with natural rubber latex had significantly increased its hydraulic conductivities by at least 200 times. Addition of rubber did not significantly drop the adsorptive capacity of thermally treated peat. These pelletized thermally treated peat exhibited self-regeneration behaviour possibly due to bacteria activities that free-up the adsorption sites for further uptake of the pollutants. This bacteria activities however did not occur with non-biodegradable pollutants. Adsorption isotherms analysis proved that the uptake of COD followed both Langmuir and Freundlich models. The low $1/n$ value means that the adsorbents is more suitable for use as a filter medium rather than the batch mode medium.

5. Acknowledgement

We would like to thank the Ministry of Science and Environment Of Malaysia for providing an IRPA grant to conduct this study and Universiti Sains Malaysia for providing all the needed facilities.

and Northern Environment in Canada (Edited by Radforth, N. W.), 84-129. Univ. Toronto Press : Toronto, Ont.

6. References

Archand, Y. and Talbot, P. (2000). Using peat to treat wastewater. *Journal Of Environmental Health*, 62, 36.

ASTM (1971) *Standard Test Method for pH of Peat Materials*, ASTM D2973-D2978, D2980 and D2944. In AOAC Official Methods of Analysis, 15th edition (Helrich, K., ed.), 1, pp 37. Virginia : AOAC Inc.

Couillard, D. (1994). The use of peat in waste water treatment. Review. *Wat. Res.* 28(6), 1261-1274.

Darah, I. And Halim, O. (1995). Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. *Journal Ethnopharmacology*. 45, 151-156

HACH (1992). *Water Analysis Handbook*. 2nd Edition. HACH Company, USA.

Heikkinen, K., Ihme, R. and Lakso, E. (1995). Contribution of cation exchange property of overflow wetland peat to removal of NH_4^+ discharged from some Finnish peat mines, *Applied Geochemistry*, 10, 207-214

M.A. Nawi, M.Z. Ibrahim, S.S.Chow and Md.Sariff Jab (2004). Thermal treatment of tropical peat soils for improved adsorption properties. *Int. Peat J.* 12, 133-141.

McLellan, J.K. & Rock, C.A. (1986). The application of peat in environmental pollution control : a review. *Int. Peat. J.* 1, 1-14.

Nichos, D.S. and Higgins, D.A. (2000) Long term wastewater treatment effectiveness of a northern Wisconsin peatland. *Journal of Environmental Quality*. 29, 1703-1714

Papp, C.S.E. and Harms, T.F. (1985). Comparison of digestion methods for total elemental analysis of peat and separation of its organic and inorganic components. *Analyst*, 110, 237-242.

Stevenson, F.J., (1994). *Humus chemistry : Genesis, Composition, Reactions*, 2nd Ed. Wiley, New York.

Thun, R., Fagernas, L and Brandt, J. (1983). Use of thermally treated peat for water purification. In *Proc. Int. Symposium on Peat Utilization* (Fuchsman, C.H. and Spigarelli, S.A., eds.), p. 365-379. Minnesota: Bemidji State University.

Viraraghavan, T. & Ayyaswami, A. (1987). Use of peat in water pollution control: a review. *Can. J. civ. Engng.* 14, 230-233.

Walmsley M. E. (1973). Physical and chemical properties of peat. In *Pap. Muskeg. Conf. : Muskeg*



Preparation and characterization of porous PMMA-SiO₂ hybrid membrane

Muhammad Ali Zulfikar ¹⁾ and Abdul Wahab Mohammad ²⁾

- 1) Department of Chemical and Process Engineering - Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi - Selangor Darul Ehsan - Malaysia
e-mail: fikar60@yahoo.com
- 2) Department of Chemical and Process Engineering - Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi - Selangor Darul Ehsan - Malaysia
e-mail: wahabm@eng.ukm.my

Abstract

Poly(methyl methacrylate) (PMMA)-SiO₂ hybrid membranes were prepared by sol-gel process and immersion into a water bath of ternary solutions obtained by adding additional amounts of TEOS, as inorganic precursor to PMMA solutions. Methods to obtain an intimate dispersion of the inorganic particles in the PMMA solutions were developed. A variety of the membranes were prepared by varying evaporation time after casting of ternary solution. Membranes were also cast from a binary solution of PMMA and solvent for comparison purposes. All the obtained membranes were characterized by scanning electron microscope observations, FTIR, EDX and ultrafiltration tests. The effect of the above-mentioned preparative parameters on the structure, flux and dextran retention properties of the membranes is discussed.

keywords: hybrid membranes, immersion precipitation, PMMA, sol-gel, TEOS;

1. Introduction

The preparation of organic-inorganic composite membranes with controlled properties has been a point of considerable interest over the last decade. The presence of finely dispersed inorganic particles in the polymer matrix has proven very useful in the improvement of membrane performance and properties.

Regarding membrane applications on the current period, much more severe selectivity criteria are required for membrane materials. Indeed, membrane processes under industrial development have a wide spectrum, ranging from gas separation (Nunes et al., 1999; Hu et al., 1997), pervaporation (Okumus, et al., 2003) to nano (Chowdhury et al., 2002; Sforca et al., 1999) and ultrafiltration (Mohammad and Zulfikar, 2004; Bottino et al., 2002; Schaep et al., 1998).

Hybrid membranes have been mainly prepared by sol-gel process of ternary or more polymer

solutions or suspensions, which offers several advantages over other techniques. In the sol-gel process, a ternary or more solutions or suspensions which consist of polymer, solvent and inorganic components which were include hydrolysis of metal alkoxides with water to resulting of metal hydroxides, followed by a condensation of hydroxyl groups to form a three dimensional metal oxides network. These chemical reactions are concurrent. The relative rate of each is governed by pH, solvent, water to alkoxide ratio, concentration, catalyst and temperature (Mohammad and Zulfikar, 2004; Hu et al., 1997; Landry et al., 1992a, 1992b). Phase separation can be induced by immiscibility of SiO₂ cluster in the polymer (Landry et al., 1992a, 1992b; Silveira et al., 1995). The immersion precipitation has been most widely used in the production membrane processes. A polymer solution is cast on a support in film form and immersed in a non-

solvent bath. The solvent diffuses into the non-solvent (coagulant) bath, whereas the non-solvent will diffuse into the cast polymeric film. After period of time, the exchange of solvent and non-solvent has proceeded so far that the solution becomes thermodynamically unstable and the phase separation occurred (Mulder, 1991). The porous membranes have been prepared by either of the methods described above. In this work, the membranes cast from PMMA-solvent-TEOS ternary solutions was prepared by combination of sol-gel process and the immersion precipitation technique and the effect of evaporation time on the properties and ultrafiltration performance of the membrane is discussed.

2. Experimental

Membranes were prepared as described in previous work (Mohammad and Zulfikar, 2004) from ternary solutions of poly(methyl methacrylate) (PMMA, 350,000; Aldrich), tetrahydrofuran (THF, Merck) as well as TEOS (Aldrich). PMMA was thoroughly dissolved in the respective solvent at 15% concentration polymer (w/w) in solution first. TEOS was added directly to the solution under continuous agitation. Then acidic solution (pH = 2) were added in stoichiometric amount (TEOS:H₂O = 1:4) and mixed for 24 h more at ambient temperature. The final composition solution of PMMA/TEOS was 80/20 (w/w). The homogeneous solution above was left for 24 hours to release air bubbles. Solutions were poured onto a glass plate and cast as thin films (thickness ca. 350 μm) and was allowed to exposure at room temperature for 1, 24 and 48 hours and then immersed in a water bath at 25°C. Finally, the membranes were obtained then dried at 60 °C in vacuum for 5 hours. Membrane surfaces and cross-sections were observed under a scanning electron microscope (SEM, Oxford Instrument, 7353, England). All specimens were coated with a thin layer of gold before SEM observation. Cross-sections were prepared by fracturing the membranes at liquid nitrogen temperature. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectra of the hybrid membranes were recorded between 4000 and 450 cm^{-1} on a Bio-Rad, FTS 165 spectrometer. Samples for FTIR were prepared in the form of KBr pellets method. A minimum of 18 scans signal was averaged with a resolution of 2 cm^{-1} at the 4000 - 450 cm^{-1} in

the ranges. The chemical analysis of the hybrid membranes was analyzed by Energy Dispersive X-Ray, EDX (Oxford Instrument, 7353, England). The hybrid membranes were fractured in liquid nitrogen and coated with Au by sputtering. Analysis was carried out on selected areas. Membrane samples (surface 28.7 cm^2) were tested with an ultrafiltration (UF) laboratory unit with an aqueous solution of dextran with nominal average molecular mass, 70 kDa (Sigma, Dextran T70). Operating conditions were: temperature 25°C, membrane pressure 3 bar and stirring speed 600 rpm. Dextran concentration in the feed (200 ppm) and permeate was determined by the calorimetric method (Dubois et al., 1956).

3. Results and discussion

Fig. 1 shows SEM micrographs of the cross section and skin layer surface of the hybrid membranes prepared by sol-gel (Figs. 1 a and b) which was obtained by adding to PMMA solution (15 wt.%) at ratio (80/20) of PMMA/TEOS. It is apparent that membranes obtained by sol-gel have co-continuous structure and are not affected by the addition of TEOS to the PMMA solution. The polymer matrix generally hides SiO₂ particles. The skin layer surface of the membrane prepared by sol-gel appears to be smooth.

Whole cross-sections of the membranes prepared in the combined use of sol-gel process and the immersion precipitation are shown in Fig. 2 (a,b). Water was used as the non-solvent. When the evaporation period was 24 h, pores were formed in almost the whole cross-sections. However, most of the pores appeared become bigger after 48 h.

Figure 3 shows structures near top surface contacted with non-solvent. When evaporation period 24 h, the pores formed near the top surface (Fig.3a). As the evaporation period increased to 48 h, the size of the pore became bigger near the top surface (Fig. 3b).

Formation of membrane structures as shown in Fig. 2 a,b and 3 a,b is explained as follows. The morphology is closely related to the nature of the interactions between phases because morphology results from a competition between the cross linking kinetics (formation of SiO₂ clusters and bonding to PMMA), the phase separation kinetics due to the immiscibility of SiO₂ clusters in the polymer

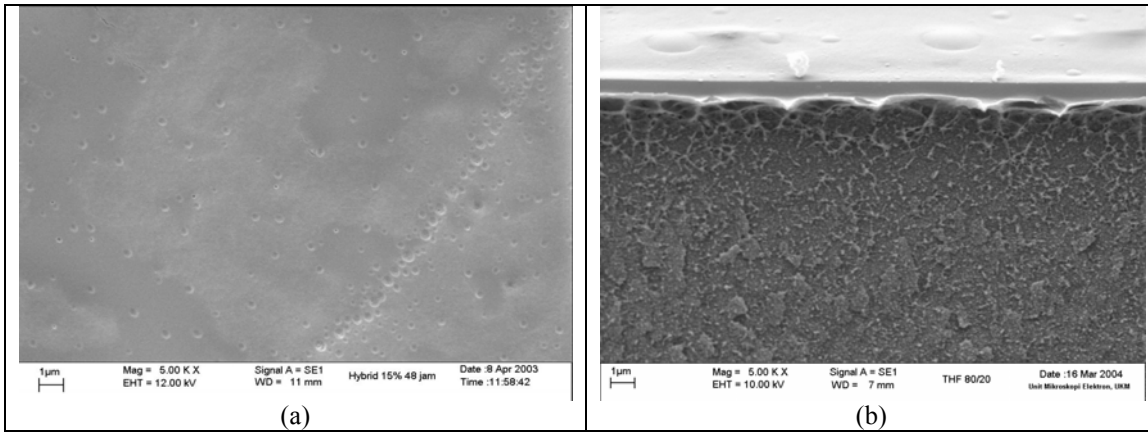


Fig. 1. SEM micrographs of hybrid membrane prepared by normal sol-gel: (a) top surface, (b) cross section

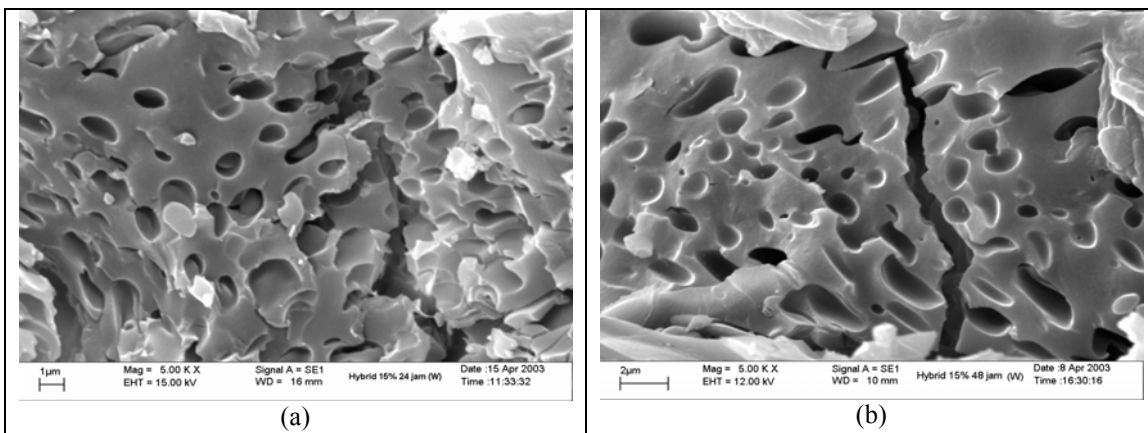


Fig. 2. SEM micrographs of cross section of hybrid membranes prepared in combined use of sol-gel and immersion precipitation: (a) immersion period – 24 h, (b) immersion period – 48 h

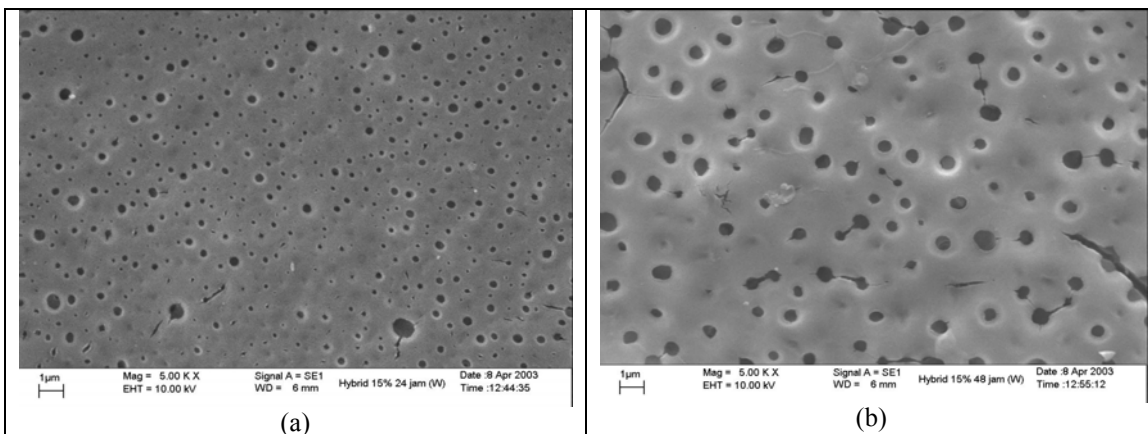


Fig. 3. SEM micrographs of top surface of hybrid membranes prepared in combined use of sol-gel and immersion precipitation: (a) immersion period – 24 h, (b) immersion period – 48 h

and thermodynamic (Lanteme et al., 1996; Silveira et al., 1995; Landry et al., 1992a, 1992b). In hybrid system based on high molar mass organic preformed polymer (for example PMMA), without designed functionalization, gelation is generally attributed to strong

physical links such as hydrogen bonding between uncondensed alcohol functions of the inorganic clusters and carbonyl groups of the polymer chains (Landry et al., 1992a, 1992b). During PMMA/TEOS formation, TEOS is initially homogeneously dispersed in PMMA

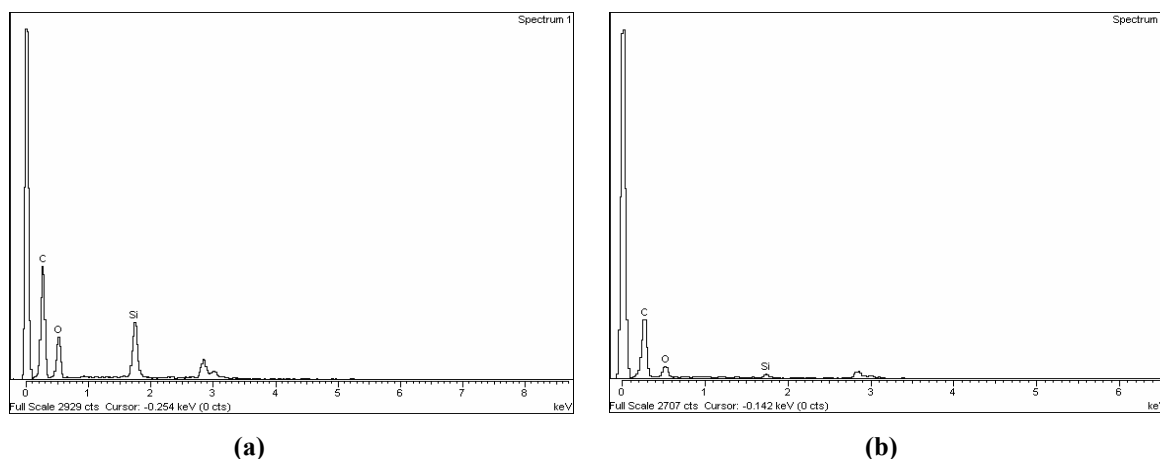


Fig. 4. EDX spectra of top surface of hybrid membranes prepared in combined use of sol-gel and immersion precipitation: (a) immersion period – 24 h, (b) immersion period – 48 h

solution. As the hydrolysis/condensation reaction goes on, the inorganic SiO_2 network is formed. The growth of SiO_2 network is entropically unfavorable towards miscibility and the enthalpy interaction between the PMMA segments and the inorganic component also deteriorates, and this condition can be due to macroscopic phase separation. A strong interaction between the PMMA and SiO_2 is necessary in order to prevent these phase separation (Lanteme et al., 1996; Silveira et al., 1995; Landry et al., 1992a, 1992b). The solvents of this study can be broadly grouped into non-polar category. In this category, weak polar interactions between the THF molecules and the polymer repeat unit was present and favors interactions between the PMMA and the SiO_2 domains, thus phase separation inhibited. THF solvent also functions as solvent swelling the growing network (Silveira et al., 1995) and diluting the unfavorable interaction between PMMA and SiO_2 as describe above.

When casting film is immersed into water bath, the exchange of solvent and non-solvent (water) occurred. According to Mulder, the difference in the solubility parameters between THF (diluent) and water (non-solvent) is large, which indicates the low mutual affinity between the diluents and the non-solvent. It is correspondent to solvent non-solvent interaction parameters, g_{12} . If miscibility solvent non-solvent was higher (low g_{12} values), non-solvent can be easily penetration to casting film. In this case, a high ratio of solvent outflow versus non-solvent inflow is achieved and in fact only the solvent diffuses

out of the casting film (Mulder, 1991). Because solvent (THF) diffuses out of the casting film, miscibility and the enthalpy interaction between the PMMA segments and the inorganic component also deteriorates, and this condition can be due to the large difference on the thermal expansion coefficient between the PMMA and silica and cause macroscopic phase separation occurred. Therefore, particles of SiO_2 can be loss during the immersion of casting film in the water bath and macro voids structure with size in the range of tenths of micrometers was obtained.

The chemical analysis of the top and bottom layer of membrane film by EDX analysis shows that the top face contains the carbon, oxygen and silicon elements (Fig.4a,b). However, the hybrid membrane that was evaporated for 48 h lower contains silicon compare to 24 h (Fig.4b). From EDX analysis also shows that the bottom face has higher contain silicon than the top face (not shown here). As described above, when casting film is immersed into water bath, the solvent diffuses out rapidly. This creates a deficiency in solvent in that region which then drives the solvent from bottom surface towards the top. The net results for this system is that the inorganic precursors which are near the bottom remain mobile for a longer period of time before vitrification, and therefore have time to grow to much and larger particles.

In Fig. 5 the ultrafiltration performance of hybrid membranes cast from ternary solutions in the two different processes is compared. It is worth observing that the reported permeate flux

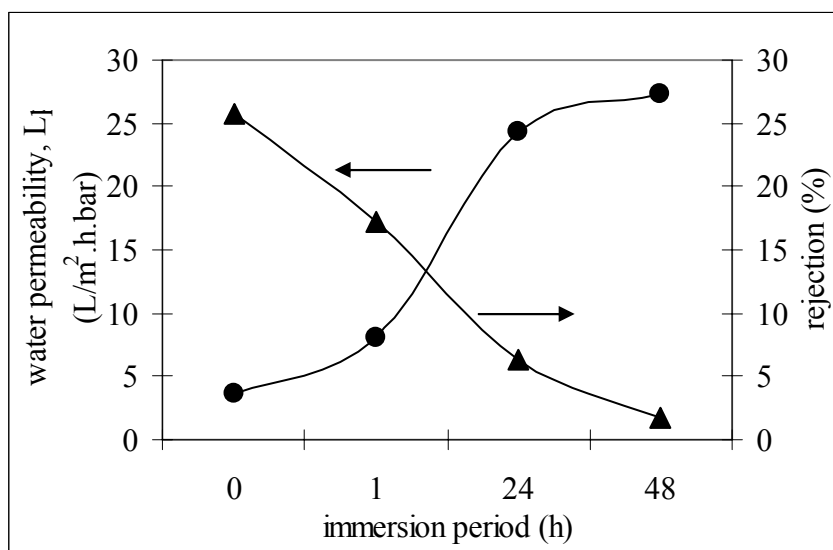


Fig. 5. Water permeability and retention of membranes as a function of immersion period: ▲ rejection, ● water permeability

and retention values are the ones taken after 15 min from the start. This is because during the UF tests, the membranes tend to compact with consequent lowering of the permeate flux. This trend, also found for other types of organic-inorganic systems (Bottino et al., 2002; Schaep et al., 1998). Fig. 5 indicates that an increase of evaporation period leads to an increase of the flux and a lowering of the retention. Obviously, the absolute values of permeate flux and retention for the three four of membranes are quite different since the structure of these membranes is different, as seen in SEM analysis (Fig.1-3).

4. Conclusions

The hybrid membranes were prepared in combined use of sol-gel and the immersion precipitation. When the membranes immersed into water, pores were formed. As the evaporation period increased, the loss of particles of SiO₂ become higher, therefore the size of the pore became bigger near the top layer. The UF performance of the membrane can be properly varied by the evaporation period increased of the ternary casting film. This fact along with the modifications induced by combined use of sol-gel and the immersion precipitation may open new avenues towards the preparation of new PMMA/SiO₂ hybrid membranes.

5. Acknowledgements

The authors wish to thank the financial support from the Institute of Technology Bandung, Indonesia and the Ministry of Science and

Technology, Malaysia through IRPA Grant 09-02-02-0070-EA 197.

6. References

- Bottino A., Caparmelli G., and Comite A., (2002). Preparation and Characterization of Novel Porous PVDF-ZrO₂ Composite Membranes, *Desalination*, 146, 35-40.
- Chowdhury S.R., Elshof J.E., Benes N.E., Keizer K., (2002). Development and Comparative Study of Different Nanofiltration Membranes for Recovery of Highly Charged Large Ions, *Desalination*, 144, 41-46.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., and Smith F., (1956). Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-361.
- Hu Q., Marand E., Dhingra S., Fritsch D., Wen J., Wilkes G., (1997). Poly(amide-imide)/TiO₂ Nanocomposite Gas Separation Membranes: Fabrication and Characterization, *Journal of Membrane Science*, 135, 65-79.
- Landry C.J.T., Coltrain B.K and Brady B.K., (1992). *In situ* Polymerization of Tetraethoxysilane in Poly(methyl methacrylate): Morphology and Dynamic Mechanical Properties, *Polymer*, 33, 7, 1486-1495.
- Landry C.J.T., Coltrain B.K., Wesson J.A., Zumbulyadis N., and Lippert J.L., (1992). *In situ* Polymerization of Tetraethoxysilane in Polymers: Chemical Nature of The Interactions, *Polymer*, 33, 7, 1496-1506.
- Lanteme B., Dumon M., Mai C., Pascault J.P., (1996). *In situ* Polymerization of Titanium

- Alkoxides in Polyvinylacetate, *Journal of Non-crystalline Solids*, 194, 63-71.
- Mohammad A.W and Zulfikar M.A., (2004). Synthesis and Characterization of Poly(methyl methacrylate)/SiO₂ Hybrid Membranes: Effect of Solvents on Structural and Thermal Properties, *submitted to Microporous and Mesoporous Materials*.
- Mulder M., (1991). Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publisher, Netherland.
- Nunes S.P., Peinemann K.V., Ohlrogge K., Alpers A., Keller M., Pires A.T.N., (1999). Membranes of Poly(ether imide) and Nanodispersed Silica, *Journal of Membrane Sci.* , 157, 219.
- Okumus E., Gurkan T., Yilmaz L., (2003). Effect of Fabrication and Process Parameters on the Morphology and Performance of a PAN-based Zeolite-filled Pervaporation Membrane, *Journal of Membrane Sci.* , 223, 23.
- Schaep J., Vandecasteele C., Leysen R., Doyen W., (1998). Salt Retention of Zirfon Membranes, *Separation and Purification Technology*, 14, 127.
- Sforca M.L., Yoshida I.V.P., Nunes S.P., (1999). Organic-Inorganic Membranes Prepared from Polyether Diamine dan Epoxy Silane, *Journal of Membrane Science*, 159, 197-207.
- Silveira, K.F., Yoshida I.V.P., and Nunes S.P., (1995). Phase Separation in PMMA/Silica Sol-gel Systems, *Polymer*, 36, 7, 1425-1434.

Kualiti Air di Tasik Chini, Pahang, Malaysia

M. Shuhaimi-Othman, Mohd Barzani, Lim Eng Chong dan Mushrifah Idris

Pusat Pengajian Sains Sekitaran & Sumber Alam
Fakulti Sains & Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600, Bangi, Selangor

Abstrak

Satu kajian kualiti air di Tasik Chini telah dijalankan pada bulan Disember 2004 iaitu dalam musim hujan. Sebanyak 15 stesen persampelan telah dipilih dan sebanyak 14 parameter kualiti air telah ditentukan dalam kajian ini. Keputusan yang diperolehi menunjukkan nilai purata keseluruhan tasik bagi parameter suhu adalah 27.28 ± 0.82 °C, oksigen terlarut (DO) 5.83 ± 0.62 mg/L, konduktiviti 23.55 ± 3.44 μ S/cm, jumlah pepejal terlarut (TDS) 15.1 ± 2.2 mg/L, kekeruhan 32.31 ± 42.17 NTU, pH 6.56 ± 0.22 , klorofil-a 0.88 ± 0.239 μ g/L, ammonia-N 0.407 ± 0.254 mg/L, nitrat 0.027 ± 0.027 mg/L, fosfat 0.077 ± 0.025 mg/L, sulfat tidak dikesan, permintaan oksigen kimia (COD) 12.85 ± 3.26 mg/L, permintaan oksigen biokimia (BOD) 0.78 ± 0.42 mg/L dan jumlah pepejal terampai (TSS) 29.78 ± 25.00 mg/L. Perbandingan dengan nilai Piawaian Interim Kualiti Air Kebangsaan (INWQS) menunjukkan secara amnya parameter yang dikaji berada dalam kelas I-II kecuali TSS dan kekeruhan yang agak tinggi (kelas II) berbanding pada musim kering akibat kemasukan air daripada sungai Pahang ke dalam Tasik Chini. Pengiraan nilai IKA menunjukkan tasik ini dikategorikan sebagai kelas II (84.91 ± 5.39) di mana ianya selamat untuk kegiatan rekreasi.

Kata kunci: Tasik Chini, kualiti air, tanah benches

1. Pendahuluan

Tasik Chini merupakan tasik semula jadi yang kedua terbesar di Malaysia dan terletak di bahagian Tenggara negeri Pahang. Keluasan Tasik Chini berubah-ubah dan bergantung pada musim sama ada musim tengkujuh atau kering, dimana julatnya adalah di antara 150-350 hektar (Chong, 2001). Ia terdiri daripada 12 kawasan air terbuka yang dikenali sebagai 'laut' oleh penduduk tempatan dan menerima air dari sungai-sungai kecil di sekitar kawasan tadahan hutan Chini sebelum mengalir keluar ke Sungai Pahang melalui Sungai Chini. Pada tahun 1994, satu empangan kecil telah dibina di kuala Sungai Chini untuk menakung air tasik bagi tujuan pelancongan. Empangan tersebut telah menyebabkan pengaliran air tasik menjadi kurang dinamik. Kajian telah menunjukkan terdapatnya tren penurunan beberapa parameter fizikal dan kimia air tasik akibat pembangunan yang tidak terancang di sekeliling tasik (Shuhaimi-Othman *et al.*, 2005; Mushrifah

Idris & Ahmad Abas Kutty, 2004).

Persampelan air dalam kajian ini telah dijalankan pada bulan Disember dimana ianya dalam musim hujan dan terdapat kemasukan air daripada Sungai Pahang ke dalam tasik Chini. 14 parameter kualiti air telah dikaji bagi melihat status kualiti air pada bulan tersebut (musim hujan) dan dikelaskan dengan menggunakan Piawaian Interim Kualiti Air Kebangsaan Negara (INWQS). Indeks Kualiti Air (IKA) ditentukan untuk melihat status kualiti air Tasik Chini secara keseluruhan.

2. Bahan dan Kaedah

Sebanyak 15 stesen persampelan yang merangkumi kesemua 12 kawasan jasad air terbuka atau 'laut' di Tasik Chini telah dipilih dalam kajian ini (Rajah 1). Di setiap stesen, sampel air permukaan diambil (3 replikasi) dan disimpan dalam botol HDPE 500 ml untuk analisis makmal (fosfat, nitrat, ammonia, sulfat, COD dan TSS), botol dan botol kaca gelap

BOD 300 ml. Sampel air yang diambil disimpan dalam kotak berisi ais untuk tujuan pengawetan (suhu < 4 °C).

Parameter in-situ

Parameter *in-situ* ditentukan dengan menggunakan HYDROLAB DataSonde[®] 4 dan Surveyer[®] 4a. Parameter yang diukur adalah suhu, oksigen terlarut (DO), pH, konduktiviti, jumlah pepejal terlarut (TDS), kekeruhan dan klorofil-a. Kalibrasi ke atas prob berlainan dilakukan dimakmal sebelum pengukuran parameter di lapangan.

Analisis Makmal

Sampel yang diambil dari stesen persampelan diuji untuk 7 parameter kualiti air iaitu permintaan oksigen biokimia (BOD), permintaan oksigen kimia (COD), jumlah pepejal terampai (TSS), ammonia-N, nitrat, sulfat dan fosfat. Semua kaedah adalah mengikut kaedah yang disarankan oleh kaedah piawai (APHA 1992) dan HACH (2003). Enam parameter iaitu pH, DO, COD, BOD, ammonia-N dan TSS digunakan dalam pengiraan IKA seperti yang dicadangkan oleh Jabatan Alam Sekitar, Malaysia.

3. Hasil dan Pembahasan

Keputusan parameter kualiti air di 15 stesen persampelan bagi bulan Disember 2004 di Tasik Chini ditunjukkan dalam Jadual 1. Hasil yang diperolehi menunjukkan nilai purata keseluruhan tasik (julat minima-maksima) bagi parameter suhu adalah 27.28 ± 0.82 °C (26.8-28.1 °C), oksigen terlarut (DO) 5.83 ± 0.62 mg/L (4.9-7.3 mg/L), konduktiviti 23.55 ± 3.44 µS/cm (20.3-30.7 µS/cm), jumlah pepejal terlarut (TDS) 15.1 ± 2.2 mg/L (13.0-19.7 mg/L), turbiditi/kekeruhan 32.31 ± 42.17 NTU (0-130.9 NTU), pH 6.56 ± 0.22 (6.2-6.8), klorofil-a 0.88 ± 0.239 µg/L (0.3-1.2 µg/L), ammonia-N 0.407 ± 0.254 mg/L (<0.02-0.9 mg/L), nitrat 0.027 ± 0.027 mg/L (0-0.1 mg/L), fosfat 0.077 ± 0.025 mg/L (0.04-0.1 mg/L), sulfat tidak dikesan, permintaan oksigen kimia (COD) 12.85 ± 3.26 mg/L (7.4-17.7 mg/L), permintaan oksigen biokimia (BOD) 0.78 ± 0.42 mg/L (0.3-1.8 mg/L) dan jumlah pepejal terampai (TSS) 29.78 ± 25.00 mg/L (1.6-74.2 mg/L). Perbandingan dengan nilai Piawaian Interim Kualiti Air Kebangsaan (INWQS; JAS 1992) menunjukkan secara amnya parameter yang dikaji berada dalam kelas I-II kecuali TSS dan kekeruhan yang agak tinggi (kelas II)

berbanding pada musim kering (Shuhaimi-Othman *et al.*, 2005) akibat kemasukan air dari sungai Pahang ke Tasik Chini, terutama di stesen 4a dan 4b yang berhampiran dengan Sg. Chini. Terdapat pengurangan oksigen terlarut di stesen 2 dan 4a yang di klasifikasi sebagai kelas III (4.9 mg/L) mengikut INWQS (3-5 mg/L). Pengiraan nilai IKA menunjukkan tasik ini dikategorikan sebagai kelas II (84.91 ± 5.39) di mana ianya selamat untuk kegiatan rekreasi yang melibatkan sentuhan badan manakala stesen 10, 11 dan 12 di kelaskan dalam kelas I (>91.76).

Perbandingan diantara stesen menunjukkan terdapatnya tren dimana stesen 1-4 yang terletak di kawasan berhampiran resort dan penempatan penduduk mempunyai beberapa bacaan parameter yang lebih tinggi/merosot seperti DO, COD dan ammonia-N berbanding stesen 11 dan 12 yang terletak lebih jauh daripada kawasan tersebut. Kepekatan nutrien seperti nitrat dan fosfat yang merupakan penyumbang utama proses eutrofikasi didapati hadir dalam kuantiti yang rendah (0.0-0.1 mg/L).

4. Kesimpulan

Kajian ini menunjukkan secara amnya parameter kualiti air yang dikaji di 15 stesen di Tasik Chini berada dalam kelas I-II (INWQS dan IKA) kecuali parameter oksigen terlarut dan TSS di beberapa stesen persampelan (kelas III) akibat musim tengkujuh pada bulan tersebut.

5. Penghargaan

Kajian ini telah dibiayai oleh geran penyelidikan IRPA 09-02-02-0114-EA276.

6. Rujukan

APHA, 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Ed Ke-18. Washington: American Public Health Association (APHA).

Chong, I. K., 2001. *Laporan Persidangan Tahunan Pengurus Kanan Jabatan Pengaliran dan Saliran Malaysia* 2001. Jabatan Pengaliran dan Saliran Negeri Pahang.

HACH, 2003. *The Handbook of DR/2500 Laboratory Spectrophotometer*. USA: HACH Company.

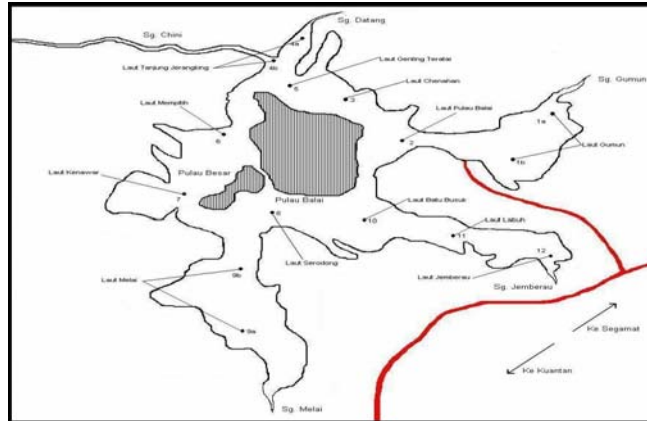
JAS, 1992. *Laporan Kualiti Alam Sekitar Malaysia* 1990. Kuala Lumpur, Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar.

M. Shuhaimi-Othman, Mohd Barzani, Lim Eng Chong dan Mushrifah Idris

Mushrifah Idris, Ahmad Abas Kutty, 2004. Trends of physico-chemical water quality in Tasik Chini. Dalam Mushrifah Idris, Khatijah Hussin & Abdul Latiff Mohammad (pnyt). *Khazanah Tasik Chini*. Bangi: Penerbit Universiti Kebangsaan Malaysia. (dlm. Penerbitan).

Shuhaimi-Othman, M., Lim, E.C., Mushrifah, I., Shaharudin, I., 2005. Kualiti air dan logam berat di Tasik Chini, Pahang. Prosiding Seminar IRPA RMK-8, Kategori EAR, Jilid II, 216-220.

LAMPIRAN



Rajah 1. Peta menunjukkan 12 'laut' dan 15 stesen persampelan di Tasik Chini, Pahang.

Jadual 1: Purata (± sisihan piawai) parameter kualiti air dan nilai IKA di 15 stesen persampelan di Tasik Chini bagi bulan Disember 2004.

Stesen	Suhu (°C)	Konduktiviti, (µS/cm)	TDS (mg/L)	DO (%)	DO (mg/L)	pH	Turbiditi (NTU)	Klorofil-a (µg/L)
1a	26.83 ± 0.01	21.53 ± 0.050	13.8 ± 0.1	70.20 ± 1.06	5.61 ± 0.08	6.26 ± 0.01	10.63 ± 1.03	1.31 ± 0.051
1b	27.27 ± 0.01	21.65 ± 0.058	13.9 ± 0.1	72.60 ± 0.37	5.76 ± 0.03	6.28 ± 0.01	9.68 ± 0.61	0.92 ± 0.022
2	26.91 ± 0.11	21.93 ± 0.050	14.0 ± 0.1	61.95 ± 6.52	4.94 ± 0.51	6.18 ± 0.01	17.85 ± 3.51	0.85 ± 0.032
3	26.43 ± 0.17	22.23 ± 0.585	14.2 ± 0.4	68.70 ± 4.57	5.53 ± 0.35	6.49 ± 0.09	60.20 ± 19.43	0.79 ± 0.019
4a	25.44 ± 0.16	29.83 ± 0.320	19.1 ± 0.2	59.75 ± 3.33	4.90 ± 0.25	6.82 ± 0.04	115.85 ± 3.48	0.69 ± 0.026
4b	26.02 ± 0.08	28.65 ± 0.619	18.3 ± 0.4	66.90 ± 0.63	5.43 ± 0.05	6.89 ± 0.04	130.95 ± 17.66	0.66 ± 0.013
5	27.21 ± 0.14	21.38 ± 0.045	13.7 ± 0.1	71.88 ± 1.51	5.71 ± 0.11	6.62 ± 0.01	50.94 ± 3.51	0.88 ± 0.032
6	27.66 ± 0.26	20.44 ± 0.134	13.1 ± 0.1	70.84 ± 3.64	5.58 ± 0.25	6.62 ± 0.03	45.62 ± 3.81	0.88 ± 0.045
7	28.10 ± 0.08	20.30 ± 0.00	13.0 ± 0.1	71.86 ± 2.04	5.62 ± 0.15	6.64 ± 0.02	33.00 ± 3.08	1.17 ± 0.013
8	28.10 ± 0.03	21.80 ± 0.115	14.0 ± 0.1	74.53 ± 0.97	5.82 ± 0.07	6.62 ± 0.01	8.13 ± 0.82	1.04 ± 0.018
9a	27.84 ± 0.03	21.80 ± 0.082	14.0 ± 0.1	79.78 ± 0.36	6.26 ± 0.02	6.76 ± 0.01	0.18 ± 0.21	1.20 ± 0.014
9b	28.01 ± 0.05	21.80 ± 0.082	14.0 ± 0.1	81.08 ± 1.53	6.35 ± 0.12	6.75 ± 0.03	1.68 ± 0.63	0.94 ± 0.021
10	28.16 ± 0.07	24.75 ± 0.238	15.8 ± 0.2	81.78 ± 1.64	6.39 ± 0.12	6.51 ± 0.05	0	0.84 ± 0.010
11	27.59 ± 0.09	30.75 ± 1.112	19.7 ± 0.7	77.95 ± 0.57	6.15 ± 0.03	6.72 ± 0.01	0	0.66 ± 0.010
12	27.67 ± 0.03	24.40 ± 0.115	15.7 ± 0.1	93.73 ± 0.87	7.34 ± 0.06	6.30 ± 0.01	0	0.37 ± 0.019

Stesen	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	TSS (mg/L)	NH ₃ -N (mg/L)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	IKA
1a	1.89 ± 0.29	17.70 ± 0.00	17.33 ± 1.25	0.333 ± 0.021	0.017 ± 0.012	0.103 ± 0.021	ND	81.29
1b	0.81 ± 0.08	17.25 ± 1.76	14.33 ± 3.78	0.290 ± 0.017	0.033 ± 0.029	0.013 ± 0.015	ND	84.62
2	0.30 ± 0.17	16.65 ± 1.06	18.67 ± 1.25	0.300 ± 0.017	0.027 ± 0.006	0.097 ± 0.023	ND	81.39
3	0.69 ± 0.31	12.60 ± 0.14	46.67 ± 2.25	0.637 ± 0.084	0.017 ± 0.012	0.093 ± 0.023	ND	80.63
4a	0.26 ± 0.17	7.40 ± 0.28	72.72 ± 3.51	0.803 ± 0.162	0.067 ± 0.006	0.097 ± 0.029	ND	77.25
4b	0.66 ± 0.02	7.60 ± 0.14	74.17 ± 0.76	0.897 ± 0.095	0.033 ± 0.040	0.043 ± 0.015	ND	78.64
5	0.50 ± 0.00	9.60 ± 0.56	61.50 ± 2.17	0.543 ± 0.136	0.007 ± 0.006	0.080 ± 0.010	ND	81.93
6	0.59 ± 0.29	12.00 ± 0.70	42.22 ± 1.07	0.513 ± 0.047	0.007 ± 0.012	0.073 ± 0.015	ND	82.51
7	0.62 ± 0.46	12.90 ± 2.12	43.67 ± 1.75	0.507 ± 0.061	0.033 ± 0.031	0.070 ± 0.017	ND	82.50
8	0.78 ± 0.05	13.50 ± 1.41	20.89 ± 2.16	0.320 ± 0.030	ND	0.087 ± 0.023	ND	85.72
9a	1.41 ± 0.67	15.80 ± 2.12	10.17 ± 1.89	0.180 ± 0.017	ND	0.080 ± 0.020	ND	88.75
9b	0.56 ± 0.06	15.20 ± 0.42	12.17 ± 2.02	0.233 ± 0.025	0.037 ± 0.035	0.063 ± 0.015	ND	88.81
10	0.78 ± 0.10	10.60 ± 5.37	7.50 ± 1.323	0.107 ± 0.012	0.100 ± 0.070	0.067 ± 0.015	ND	91.97
11	1.04 ± 0.76	12.70 ± 0.99	3.00 ± 0.500	0.033 ± 0.006	0.020 ± 0.026	0.083 ± 0.050	ND	92.26
12	0.91 ± 0.17	11.20 ± 0.84	1.67 ± 0.289	< 0.02	0.003 ± 0.006	0.110 ± 0.060	ND	95.40

ND – tidak dikesan

Korelasi Umum Konstanta Henry untuk Sistem Solute Polar dalam Polimer

M. Arif Batutah, Gede Wibawa dan Kuswandi

Jurusan Teknik Kimia, FTI. ITS Surabaya

Telp 031-5946240, Fax. 031-5999282, E-mail : gwibawa2003@yahoo.com (G.wibawa)

Abstark

Dalam penelitian ini, Konstanta Henry dari solute polar dalam polimer diperoleh dari finite concentration data VLE (vapor liquid equilibrium) dengan metode ekstrapolasi persamaan UNIQUAC pada limit konsentrasi solute mendekati nol. Hasil ekstrapolasi tersebut di crosscheck dengan data infinite dilution yang diperoleh dari metode inversi gas liquid chromatography (IGC) melalui hubungan linier antara $\ln 1/K_p$ dengan $1/T$. Hasil yang diperoleh untuk sistem 11 solute polar dalam 4 polimer menunjukkan suatu konsistensi yang baik kecuali untuk sistem acetone- polyvinyl acetate. Dari kedua metode tersebut dibuat korelasi umum, yang didasarkan pada prinsip corresponding state untuk masing-masing polimer.

Key Word : *Finite Concentration, Infinite Dilution, Korelasi Umum, Konstanta Henry*

1. Pendahuluan

Material polimer telah dikembangkan dalam penerapan berbagai kebutuhan, seperti kedirgantaraan, otomotif, elektronik, biomedis, perabotan rumah tangga dan lain-lain. Material-material tersebut umumnya diproses dengan melibatkan solven yang mempunyai berat molekul rendah dimana solven dan monomer yang tidak terpolimerisasi harus diambil dari produk akhir agar produk tersebut memenuhi standart kesehatan, keselamatan dan peraturan-peraturan lingkungan.

Untuk maksud tersebut pengetahuan kesetimbangan uap-cair (VLE) untuk sistem solute-polimer sangat diperlukan. Data eksperimen pada kondisi finite concentration dan infinite dilution telah di publikasikan oleh Wen, dkk. (1992^a dan 1992^b), namun data tersebut masih sangat terbatas. Data eksperimen sangat berguna sebagai basis dalam mengembangkan teori larutan, sehingga validitas data eksperimen sangat penting. Untuk zat-zat dengan berat molekul rendah, tes konsistensi termodinamika didasarkan pada persamaan Gibbs-Duhem, seperti tes luasan yang diusulkan oleh Herington (1951) telah

digunakan secara luas untuk menguji konsistensi data eksperimen VLE sistem biner. Tetapi tes konsistensi tersebut tidak dapat diterapkan untuk VLE sistem solute-polimer, karena fase uap tidak mengandung polimer.

Untuk data VLE sistem solute-polimer, Takashima, dkk. (2003) telah mengembangkan metode validasi data eksperimen yang disebut metode crosschecking dengan memanfaatkan hubungan linier antara konstanta Henry dengan inverse temperatur, dimana sistem yang diuji validasinya adalah sistem yang mengandung solven non polar.

Pada penelitian ini metode tersebut digunakan untuk menguji validitas data eksperimen yang mengandung solute polar yaitu methanol, ethanol, propanol, 2-propanol, butanol, 2-butanol, 2 methyl-1-propanol, acetone, methyl ethyl ketone, methyl acetate dan propyl acetate dalam 4 polimer polyisoprene (PI), polyisobuthylene (PIB), poly-n-buthyl methacrylate (PBMA) dan poly vinyl acetate (PVAc). Dari data tersebut dikembangkan korelasi umum untuk masing-masing polimer.

2. Metode Ekstrapolasi

Koefisien aktifitas infinite dilution diperoleh dari ekstrapolasi data finite concentration VLE, pada konsentrasi mendekati nol menggunakan persamaan UNIQUAC yang dikemukakan oleh Abrams dan Prausnitz (1975). Parameter interaksi solubilitas untuk sistem 11 solute polar dalam 4 polimer pada range temperatur 293,2 -353,2 K. telah dilaporkan oleh Wibawa, dkk (2002) dan parameter tersebut digunakan dalam penelitian ini. Koefisien aktifitas fraksi massa komponen 1 pada kondisi infinite dilution, Ω_1^∞ didefinisikan sebagai berikut :

$$\Omega_1^\infty = \lim_{w_1 \rightarrow 0} \left(\frac{a_1}{w_1} \right) \quad (1)$$

Persamaan UNIQUAC pada kondisi tersebut ditulis :

$$\ln \Omega_1^\infty = \ln \Omega_1^{C^\infty} + \ln \gamma_1^{R^\infty} \quad (2)$$

dimana

$$\ln \Omega_1^{C^\infty} = \ln \left(\frac{r_1 M_2}{r_2 M_1} \right) + 1 - \frac{n_1^{rep} r_1}{n_2^{rep} r_2} - \frac{z}{2} q_1 n_1^{rep} \left[\ln \left(\frac{r_1 q_2}{q_1 r_2} \right) + 1 - \frac{r_1 q_2}{r_1 q_2} \right] \quad (3)$$

$$\ln \gamma_1^{R^\infty} = q_1 n_1^{rep} (-\ln \tau_{21} + 1 - \tau_{12}) \quad (4)$$

$$\tau_{ij} = \exp \left(- \frac{a_{ij}}{RT} \right) \quad (5)$$

konstanta Henry fraksi massa dari solute, H_1 di definisikan sebagai berikut :

$$H_1 = \lim_{w_1 \rightarrow 0} \left(\frac{f_1}{w_1} \right) \quad (6)$$

dimana f_1 adalah fugasitas solute dalam Pa, selanjutnya konstanta Henry dihitung dari koefisien aktifitas pada kondisi infinite dilution dengan persamaan sebagai berikut :

$$H_1 = \Omega_1^\infty f_1^{0L} \quad (7)$$

Pada tekanan rendah, fugasitas liquid murni dari compenen 1, f_1^{0L} adalah sama pada tekanan uapnya. Definisi lain dari konstanta Henry adalah :

$$K_p = \frac{P_1}{V_1^0} \quad (8)$$

dimana P_1 adalah tekanan parsial solute dalam Pa, dan V_1^0 adalah solubilitas solven dalam molten polimer dalam m³ (STP)/kg polimer dan

K_p adalah konstanta Henry dalam Pa kg polimer/m³(STP). Sehingga hubungan antara konstanta Henry H_1 dan K_p adalah :

$$H_1 = \frac{0.022414 K_p}{M_1} \quad (9)$$

dimana M_1 adalah berat molekul solute.

3. Konsistensi data finite concentration dengan data infinite dilution.

Koefisien aktifitas pada infinite dilution dari solute dalam polimer mempunyai suatu hubungan linier dalam term logaritma konstanta Henry dengan invers temperatur. Hubungan ini dapat diaplikasikan untuk membuktikan konsistensi finite concentration data VLE untuk polimer dengan data infinite dilution. Konsistensi dari hasil penelitian yang diperoleh dengan ekstrapolasi persamaan UNIQUAC di crosscheck dengan data eksperimen infinite dilution yang diperoleh dari metode IGC yang telah dikonversi ke K_p melalui persamaan (9). Untuk solubilitas 11 solute polar dalam PI, PIB, PBMA dan PVAc. data infinite dilution dibandingkan dengan perhitungan solubilitas oleh persamaan UNIQUAC dalam term hubungan linier logaritma konstanta Henry dengan invers temperatur dimana kedua jenis data tersebut menunjukkan adanya hubungan yang linier sebagaimana yang diilustrasikan pada Gambar 1 - 3, kecuali untuk sistem acetone-PVAc pada 373,2 -473,2 K. Analisa sulit dilakukan terhadap sistem tersebut karena error dari data IGC cukup tinggi dari satu peneliti dengan yang lain seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Konstanta Henry yang diperoleh dari data VLE pada kondisi finite concentration dan dari data infinite dilution dikorelasikan menggunakan persamaan Van't Hoff berikut :

$$\ln \frac{1}{K_p} = a + \frac{b}{T} \quad (10)$$

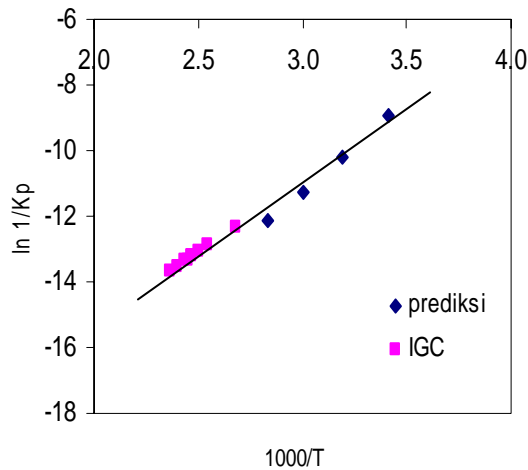
dimana a dan b adalah konstanta yang tergantung dari masing-masing sistem. Hasil dari korelasi persamaan tersebut dibuat average absolute deviation (AAD) dan ditampilkan dalam tabel 2.

4. Korelasi Umum Konstanta Henry

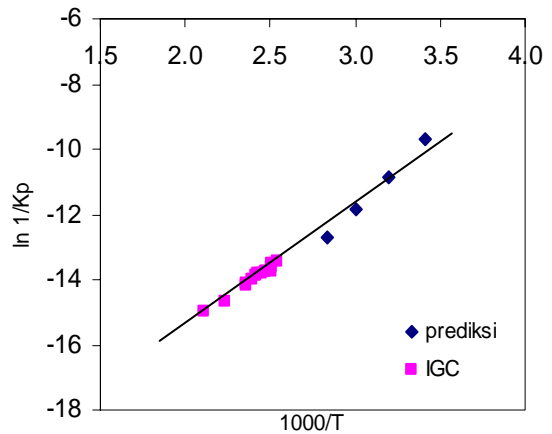
Korelasi umum konstanta Henry sistem solute-polimer dikembangkan dan didasarkan pada prinsip corresponding state, prinsip ini

membutuhkan konstanta kritis solute. Metode ini telah dikembangkan diantaranya oleh Stiel, dkk (1985), Chiu dan Chen (1996) untuk solute non polar. Pada penelitian ini kedua metode tersebut diaplikasikan untuk solubilitas

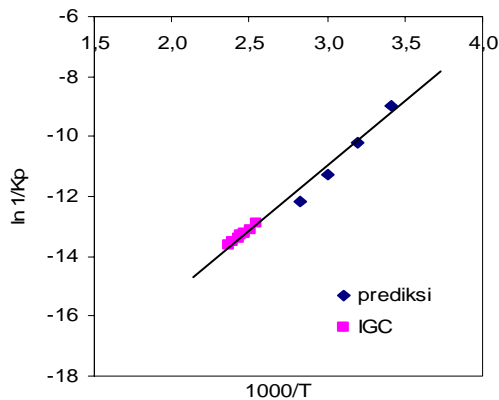
suatu analisis hubungan antara $\ln(1/K_p)$ dengan T_c/T , baik slope maupun intercept bergantung pada faktor acentrik dari masing-masing solven sebagai berikut :



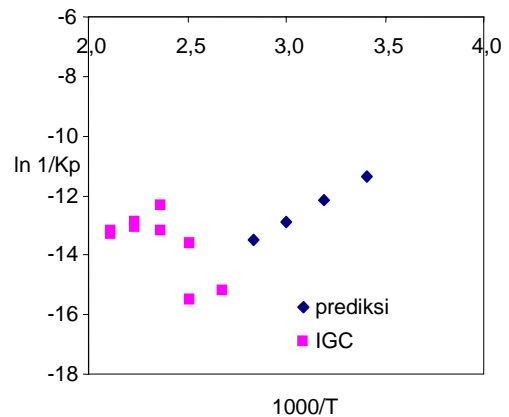
Gambar 1. Konstanta Henry propanol dalam PVA



Gambar 2. Konstanta Henry 2 propanol dalam PVAc



Gambar 3. Konstanta Henry 2 butanol dalam PVAc



Gambar 4. Konstanta Henry acetone dalam PVAc

solute polar pada PI, PIB, PBMA dan PVAc.

Korelasi yang diusulkan Stiel, dkk (1985) didasarkan pada suatu analisa hasil hubungan linier antara $\ln(1/K_p)$ dengan $(T_c/T)^2$ yang memberikan satu intercept untuk semua solute dengan slope yang tergantung pada faktor acentrik dari masing-masing solven.

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = A + (B + C \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right)^2 \quad (11)$$

konstanta A, B dan C ditentukan dari data eksperimen, sedangkan korelasi yang diusulkan oleh Chiu dan Chen (1996) didasarkan pada

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = A + B \omega + (C + D \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right) \quad (12)$$

konstanta A, B, C , dan D diregresikan dari eksperimen untuk masing-masing polimer. Untuk PI diperoleh korelasi umum berdasarkan model Stiel (1985) :

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = -17,432 + (1,394 + 2,849 \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right)^2 \quad (13)$$

dan berdasarkan model Chiu dan Chen (1996) :

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = -20,160 - 12,776 \omega + (4,313 + 10,017 \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right) \quad (14)$$

M. Arif Batutah, Gede Wibawa dan Kuswandi

AAD untuk masing-masing persamaan (13) dan persamaan (14) sebesar 13,5% dan 10,9%. Hasil ini menunjukkan bahwa untuk korelasi yang diusulkan chiu dan Chen (1996) lebih baik di banding dengan usulan Stiel, dkk. (1985). Korelasi umum konstanta Henry solven dalam PIB model Stiel, dkk. (1985) sebagai berikut :

$$\ln\left(\frac{1}{Kp}\right) = -18,704 + (0,766 + 3,837 \omega)\left(\frac{Tc}{T}\right)^2 \quad (15)$$

Sedangkan yang model Chiu dan Chend (1996) :

$$\ln\left(\frac{1}{Kp}\right) = -18,048 - 15,028\omega + (3,104 + 11,137\omega)\left(\frac{Tc}{T}\right) \quad (16)$$

korelasi persamaan (16) yang mempunyai AAD 10,9% lebih baik dari pada persamaan (15)

Tabel 2 : Parameter persamaan van't Hoff

Polimer	Solute	a	b	AAD(%)
PI	Methanol	-24,978	4,307	1,0
	Ethanol	-26,017	4,786	0,1
	Propanol	-26,121	4,915	3,6
	2-Propanol	-26,646	4,975	0,8
	Butanol	-28,954	6,161	3,2
	2-Butanol	-30,606	6,627	2,1
	2-M-1-propanol	-28,843	5,921	0,6
	Acetone	-23,605	3,624	0,9
	MEK	-24,549	4,112	0,9
	Methyl acetate	-23,698	3,647	0,1
PIB	Propyl acetate	-25,379	4,598	0,4
	Methanol	-23,783	3,982	1,4
	Ethanol	-26,810	4,988	1,1
	Propanol	-28,381	5,704	2,7
	2-Propanol	-24,488	4,632	9,1
	Butanol	-28,796	6,084	2,4
	2-Butanol	-27,488	5,446	0,2
	2-M-1-propanol	-29,413	5,936	0,8
	Acetone	-15,351	1,296	2,4
	MEK	-24,549	4,112	0,5
PBMA	Methyl acetate	-24,104	3,768	1,5
	Propyl acetate	-25,611	4,672	0,6
	Methanol	-24,456	4,159	0,8
	Ethanol	-26,714	4,957	0,5
	Propanol	-27,729	5,507	0,8
	2-Propanol	-27,729	5,507	5,7
	Butanol	-28,708	6,078	1,9
	2-Butanol	-27,958	5,590	0,2
	2-M-1-propanol	-30,100	6,200	1,0
	Acetone	-23,317	3,518	0,6
PVAc	MEK	-24,402	4,058	0,1
	Methyl acetate	-24,364	3,794	0,8
	Propyl acetate	-18,329	2,452	4,8
	Methanol	-25,857	4,476	3,0
	Ethanol	-26,760	4,992	4,6
	Propanol	-27,716	5,495	1,2
	2-Propanol	-27,346	5,163	1,4
	Butanol	-28,352	5,958	2,6
	2-Butanol	-28,016	5,800	1,2
	2-M-1-propanol	-29,051	5,835	1,1
	Acetone	-	-	-
	MEK	-24,734	4,141	0,1
	Methyl acetate	-24,578	3,867	3,1
	Propyl acetate	-25,542	4,608	3,1

* AAD = (1/NP) Σ [(1/K_p)_{perhitungan} - (1/K_p)_{percobaan}]

yang mempunyai AAD 13,5%. Untuk PBMA,

Tabel 3 : AAD antara persamaan Stiel dan Chiu dan Chen untuk 11 solute dalam PI

Polymer-solvent	Jumlah Data	AAD (%)			
		Stiel	Chiu & Chen	van't Hoff	
PI	Methanol	5	15.19	1.62	0.80
	Ethanol	4	18.18	1.29	0.11
	Propanol	4	19.65	1.33	3.59
	2-Propanol	5	17.70	1.78	0.81
	Butanol	5	20.67	3.25	3.20
	2-Butanol	4	10.15	7.82	2.13
	2-methyl-1-propanol	4	18.91	1.36	0.59
	Acetone	5	5.36	0.91	0.94
	MEK	4	6.20	0.35	0.94
	Methyl acetate	4	6.12	0.32	0.12
	Propyl acetate	4	9.23	0.52	0.45

Tabel 4 : AAD antara persamaan Stiel dan Chiu dan Chen untuk 11 solute dalam PIB

Polymer-solvent	Jumlah Data	AAD (%)			
		Stiel	Chiu & Chen	van't Hoff	
PIB	Methanol	4	2.18	2.15	1.39
	Ethanol	6	6.79	1.78	1.13
	Propanol	5	8.58	2.99	2.71
	2-Propanol	4	6.83	2.96	9.08
	Butanol	5	6.92	3.12	2.37
	2-Butanol	4	1.49	2.81	0.24
	2-methyl 1 propanol	4	9.73	4.55	0.80
	Acetone	5	16.11	4.34	2.42
	MEK	4	11.11	0.98	0.51
	Methyl acetate	6	9.63	1.60	1.50
	Propyl acetate	5	8.38	1.02	0.61

Tabel 5 : AAD antara persamaan Stiel dan Chiu dan Chen untuk 11 solute dalam PBMA

Polymer-solvent	Jumlah Data	AAD (%)			
		Stiel	Chiu & Chen	van't Hoff	
PBMA	Methanol	4	1.34	4.69	0.79
	Ethanol	4	3.87	4.40	0.54
	Propanol	5	2.57	5.69	0.85
	2-Propanol	4	3.05	5.88	5.71
	Butanol	5	1.34	8.46	1.90
	2-Butanol	4	8.62	1.56	0.22
	2methyl-1propanol	4	5.72	3.33	1.00
	Acetone	5	6.99	4.26	0.50
	MEK	4	5.95	4.42	0.08
	Methyl acetate	4	5.40	3.34	0.81
	Propyl acetate	4	4.76	5.82	4.75

korelasi dalam bentuk persamaan (11) dan (12), dalam penelitian ini :

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = -18,823 + (1,420 + 2,604 \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right)^2 \quad (17)$$

$$\ln\left(\frac{1}{K_p}\right) = -20,201 - 9,030 \omega + (4,059 + 7,524 \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right) \quad (18)$$

AAD persamaan (17) 14,5% sedang AAD persamaan (18) sebesar 14,8% untuk masing-

Tabel 6 : AAD antara persamaan Stiel dan Chiu dan Chen untuk 11 solven dalam PVAc

Polymer-solvent	Jumlah Data	AAD (%)			
		Stiel	Chiu & Chen	van't Hoff	
PVAc	Methanol	6	3.33	4.67	2.54
	Ethanol	5	1.54	1.21	4.58
	Propanol	13	2.37	4.02	0.93
	2-Propanol	19	1.74	3.72	0.75
	Butanol	17	9.30	8.77	2.26
	2-Butanol	12	2.48	2.63	1.07
	2-methyl-1-propanol	5	5.57	3.95	1.08
	Acetone	4	5.89	2.85	4.19
	MEK	4	4.85	1.60	0.07
	Methyl acetate	5	4.67	2.45	2.48
	Propyl acetate	5	4.96	2.45	3.12

Tabel 7 : AAD antara persamaan Stiel (1996) dan Chiu dan Chen (1985) untuk 4 polimer.

Polimer	AAD %	
	Stiel (1996)	Chiu dan Chen (1985)
PI	13.5	10.9
PIB	18.2	12.5
PBMA	14.5	14.8
PVAc	13.5	13.8

masing solute. Korelasi umum PVAc, analisa menunjukkan bahwa kedua korelasi baik dengan persamaan (19) maupun persamaan (20) menunjukkan AAD yang sama masing-masing 3,8%, pada korelasi ini sistem acetone-PVAc tidak diikuti, karena tidak adanya konsistensi sewaktu di crosscek

$$\ln\left(\frac{1}{Kp}\right) = -18,819 + (1,557 + 2,239 \omega)\left(\frac{T_c}{T}\right)^2 \quad (19)$$

$$\ln\left(\frac{1}{Kp}\right) = -30,210 + 7,045\omega + (10,236 - 1,972\omega)\left(\frac{T_c}{T}\right) \quad (20)$$

Untuk PIB dan PBMA, AAD menunjukkan bahwa dengan korelasi persamaan (11) dan persamaan (12) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan seperti yang ditunjukkan pada tabel 2, sehingga PBMA dan Pvc disarankan untuk menggunakan persamaan (11) karena lebih sederhana.

5. Kesimpulan

Verifikasi finite concentration data VLE dengan data infinite dilution menggunakan hubungan linier antara konstanta logaritma Henry dengan invers temperatur telah berhasil diaplikasikan untuk sistem polar-polimer, kecuali untuk sistem acetone-PVAc. Sedangkan korelasi umum konstanta Henry yang

didasarkan pada corresponding state menggunakan persamaan (11) dan (12) dapat di terapkan untuk sistem 11 solute polar dalam polimer PI, PIB, PBMA dan PVAc.

Daftar Notasi

- a konstanta persamaan (10)
- a_1 aktifitas solven
- a_{ij} parameter interaksi persamaan UNIQUAC
- b konstanta persamaan (10)
- f_i fugasitas state untuk solven murni (Pa)
- H konstanta Henry fraksi massa (Pa)
- K_p konstanta Henry (Pa kg/m³ (STP))
- M_i massa molar komponen i (kg/mol)
- n_i^{rep} number of repeat dalam componen i
- p_i tekanan parsial (Pa)
- q_i parameter luas untuk componen i
- r_i parameter volume untuk komponen i
- T temperatur (K)
- T_c temperatu kritis (K)
- T_g temperatur transisi glass (K)
- V_i^0 solubiltas solven (m³(STP)/kg)
- w fraksi massa

- z coordination number ($z = 10$)
- γ_i koefesient aktifitas komponen i
- τ_{ij} parameter interaksi persamaan UNIQUAC
- ω faktor acentrik
- Ω_i koefesien aktifitas fraksi massa komponen i
- 1 solven
- 2 polimer
- C kombinatorial
- R residual
- ∞ kondisi infinite dilution
- 6. Daftar Pustaka**
- Card, T.W.; Al-Saigh, Z.Y.; Munk, P.: *Macromolekul* 18 (1985) 379-2435
- Castells. R.C.; Mazza, G.D.; Arancibia, E.L. ; *An. Asoc. Quim. Argent.* 73 (1985) 519-530
- Castells. R.S.; Massa, G.D.; *Appl. Polym. Sci.* 32 (1986) 5917-5931
- Dipaol-Baranyi, G.; *Macromolekules* 14 (1981) 683-687
- D.s. Abrams and J.M. Parusnit, "Statistical Thermodynamics of liquid Mixtures : A New Expression for the Exces Gibbs Energy of Partly or Completely Miscible Systems", (1975) 116- 127.
- E.F.G. Herington, *J. Inst. Petrol.* 37 (1951) 457-470.
- G. Wibawa, M. Takahashi, Y. Sato, S. Takishima, H. Masuoka, " Solubilities of 11 Polar Organic Solvents in Four Polymer Using the Piezoelectric-QuartzSorption Method" *J. Chem. Eng. Data* 47 (2002) 518-524.
- Heintz, A. ; Lichtenther, R.N.; Prausnitz, J.M.; Ber, Bunsen-Ges, *Phys. Chem.* 83 (1979) 926-928.
- H. Wen, H.S. Elbro, P. Alessi, *Polymer Solution Data Collection Parts 2 + 3, DECHEMA Chemistry Data Series, DECHEMA: Frankfurt am Main, 1992.*
- J. Kim, E. Choi, K.P. Yoo and C.S. Bae, *Fluid Phase Equilib.*, 161 (1999) 283-293.
- K. Kojima, S. Zhang, T. Hiaki, *Fluid Phase Equilib.* 131 (1997) 145-179.
- L. Durrill, R.G. Griskey, *AIChE J.* 15 (1969) 106-110.
- L.I. Stiel, D.K. Chang, H.H.H. Chu, C.D. Han, J. *Appl. Polym. Sci.* 30 (1985) 1145-1165.
- Liu, D.D.; Prausnitz, J.M.; *J. Polym.Sci., Polym. Phys. Ed.* 15 (1977) 138-142
- Munk, P.; Du, Q.; Abdel Azim. A.A.; *J. Appl. Polym.Sci., Appl. Polym. Sym.* 45 (1990) 289-316
- Newman, R.D.; Prausnit, J.M.; *J. Paint. Technol.* 45 (1973) 33-45
- Prausnitz, "Molecular Thermodynamics of Fluid Phase Equiliba", Second Edition, Prentice Hall Inc, Englewood Cliffts
- R.D. Newman, J.M. Prausnitz, *J. Phys. Chem.* 76 (1972) 1492-1496.
- R.M.H. Chiu, B.D.Chen *Ind. Eng. Chem. Res.* 35 (1996) 4386-4388
- Rogalski, M. dan Malanowski, S. "Ebullimeters Modified for the Accurate Determination of Vapor-Equilibria" *Fluid Phase Equilibria*, 5, (1980) 97-112,
- Romdhane, I. H.; Danner, R.P.; *J. Chem. Eng. Data* 36 (1991) 15-20
- Sato, Y.; Inomata, H.; rai, K.; *Kobunshi Robunshu* 45 (1988) 287 - 289
- Smith, Van Ness dan Abbott, "Introduction to Chemical Engeering Thermodynamics", Fifth edition, Mc Graw-Hill Companies, Inc., Singapore . (1996), 366-387,
- S. Takishima, G. Wibawa, Y. Sato, H. Masuoka, " A generalized correlation for Henry's Law constans of nonpolar solutes in four polymer", *Fluid Phase Equilibria* 211 (2003) 241-256.
- S. Michaels, R.B. Parker, *J. Polym. Sci.* 41 (1959) 157-166
- Wals. D.J.; McKeown, J.G.; *Polymer* 21 (1980) 1335-1340
- Tseny, H.S.; Lloyd, D.R.; Ward, T.C.; *Polym. Commun.* 25 (1984) 262-265
- Wisniak Jaime, " The Herington Test for Thermodynamic Consistency", *Ind. Eng. Chem. Res.* vol. 33, (1994) 177-180

Sintesis Kopolimer Poli(ϵ -kaprolakton-co-2,2-dimetil-1,3-propandiol): Poliester Polioli Alternatif untuk Pembuatan Poli(Ester-Uretan) Yang bersifat Mudah Terbiodegradasi

M. Hasan¹⁾, S.I. Rahayu²⁾, C.L. Radiman²⁾, I. M. Arcana²⁾

1) Staf Pengajar Jurdik Kimia FKIP Univ. Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh 23111

2) Staf Pengajar Dept. Kimia FMIPA ITB Jl. Ganesa 10 Bandung 40132

Abstrak

Telah disintesis kopolimer dari senyawa ϵ -kaprolakton dan 2,2-dimetil-1,3-propandiol dengan menggunakan katalis kompleks distannoksan. Pada penelitian ini telah dipelajari pengaruh komposisi monomer yang digunakan terhadap struktur kopolimer, viskositas, dan sifat termal kopolimer yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi kandungan monomer ϵ -kaprolakton dalam campuran awal komonomer maka terjadi peningkatan kandungan monomer tersebut dalam kopolimer yang terbentuk, sehingga terjadi peningkatan titik leleh dan viskositas poliester. Hasil ini juga didukung oleh data bilangan hidroksi poliester yang menurun seiring dengan meningkatnya kandungan monomer ϵ -kaprolakton.

Kata Kunci: Sintesis, oligomer, ϵ -kaprolakton.

1. Pendahuluan

Poliester merupakan salah satu polimer sintetik yang dapat terbiodegradasi. Hal ini disebabkan karena dalam rantai utama polimer ini terdapat gugus ester (-COO) yang dapat terhidrolisis dengan baik. Poliester yang berasal dari turunan senyawa lakton memiliki sifat mudah terbiodegradasi, termoplastik, dan biokompatibel. Akan tetapi poliester ini memiliki sifat termal dan sifat mekanik yang kurang baik^[1]. Rendahnya sifat mekanik dan sifat termal dari poliester ini disebabkan polimer tersebut memiliki berat molekul yang rendah. Beberapa poliester dari kelompok ini antara lain poli- β -hidroksibutirat, poli- ϵ -kaprolakton dan polimer yang mirip dengannya dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri sebagai sumber karbon dan energi cadangan^[2].

Poliester dari senyawa lakton dengan berat molekul tinggi dapat disintesis dengan teknik polimerisasi pembukaan cincin lakton^[3,4,5]. Teknik ini dinilai kurang ekonomis karena menghasilkan rendemen yang rendah, selain itu sangat sulit memisahkan antara produk sampingan yang dihasilkan. Oleh karena itu

untuk mensintesis poliester dengan sifat mekanik dan termal yang baik perlu dicari metode sintesis yang lain yang lebih menarik dan lebih efisien.

Hori, Y^[6] telah mensintesis kopolimer dari senyawa metil (R)-3-hidroksibutirat dan 2,2-dimetil-1,3-propandiol dengan menggunakan katalis dibutiltinoksida, dimana polimer yang dihasilkan dapat digunakan sebagai polioli untuk sintesis poli(ester-uretan). Sintesis poliester dari monomer asam laktat juga telah dilakukan oleh Hiltunen^[7], Kylma^[8]. Hasilnya berupa alifatik poliester yang mudah terbiodegradasi, namun sifat mekanik dan termal yang rendah.

Melalui tulisan ini akan dilaporkan hasil sintesis kopolimer dari senyawa ϵ -kaprolakton dan 2,2-dimetil-1,3-propandiol dengan katalis kompleks distannoksan. Kopolimer ini merupakan prepolimer yang dapat diperpanjang rantainya menjadi polimer dengan berat molekul tinggi, sehingga dapat dihasilkan polimer dengan sifat mekanik dan termal yang tinggi. Prepolimer ini dapat dipolimerisasi lebih lanjut dengan berbagai jenis diisosiyanat untuk mendapatkan

poliester-uretan dengan karakteristik yang diinginkan.

2. Percobaan

2.1 Bahan

Bahan kimia utama yang diperlukan ialah: dibutiltin oksida (*Aldrich*), dibutiltin diklorida (*Aldrich*), neopentil glikol (*Aldrich*), ϵ -kaprolakton (*Aldrich*), nitrogen cair (PPTN Bandung), kloroform p.a. (*E-Merck*), n-heksana p.a. (*E-Merck*).

2.2 Metoda

2.2.1 Sintesis kopolimer

Sebanyak 0,20 g katalis distannoksian diisi ke dalam reaktor polimerisasi, selanjutnya dipanaskan pada suhu 80°C selama 4 jam dalam kondisi vakum (tekanan 2-5 mmHg). Sebanyak 5,0 g ϵ -kaprolakton dan 0,625 g 2,2-dimetil-1,3-propandiol (perbandingan mol ϵ -kaprolakton dan 2,2-dimetil-1,3-propandiol = 10 : 1) selanjutnya dimasukkan ke dalam reaktor yang telah berisi katalis, lalu divakum selama 15 menit. Kemudian dilakukan *degassing* sebanyak dua kali dengan menggunakan campuran 1 L metanol teknis dengan 500 mL nitrogen cair. Setelah itu reaktor di *seal* dalam keadaan vakum dan selanjutnya dilakukan polimerisasi dalam *batch* yang berisi minyak parafin pada suhu 100 °C selama 4 jam. Kondisi yang sama diulang untuk komposisi: mol ϵ -kaprolakton: 2,2-dimetil-1,3-propandiol adalah 20:1; 30:1; 40:1 dan 50:1.

2.2.2 Karakterisasi

Karakterisasi terhadap kopolimer meliputi penentuan struktur, penentuan viskositas, pengukuran sifat termal dan pengukuran bilangan hidroksi. Struktur oligomer yang dihasilkan ditentukan dengan alat FTIR Shimadzu series 8400 dan NMR-¹H dan NMR-¹³C. Sampel

diukur dalam bentuk pelet KBr dengan berat sampel dibuat konstan. Viskositas oligomer hasil sintesis ditentukan secara viskometri dengan alat viskometer Ostwald, dimana hasilnya dikonversi dari data waktu alir menjadi viskositas instrinsik. Penentuan sifat termal berupa titik leleh dilakukan dengan alat DTA. Bilangan hidroksi kopolimer yang dihasilkan ditentukan dengan metode titrimetri sesuai dengan prosedur ASTM D2849 – 69 sebagai berikut: Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 4 mL reagen asetilasi yang dibuat dengan mencampurkan 127 mL asam asetat anhidrida dengan 1000 mL piridin. Kemudian dipanaskan pada suhu 98 °C selama 2 jam, lalu didinginkan pada temperatur kamar. Kemudian dibilas dengan 6 mL aquadest, lalu didiamkan selama 24 jam. Tambahkan indikator pp 1 % sebanyak 3-4 tetes dan lakukan titrasi dengan larutan KOH 0,1 N. Bilangan hidroksi ditentukan dengan persamaan berikut:

$$\text{Bilangan Hidroksi (mg KOH/g)} = \frac{[(B - A)N \times 40]}{W} \quad (1)$$

Dimana: B = jumlah mL KOH yang diperlukan untuk titrasi blanko

A = jumlah mL KOH yang diperlukan untuk titrasi sampel

N = Normalitas KOH

W = berat sampel (g)

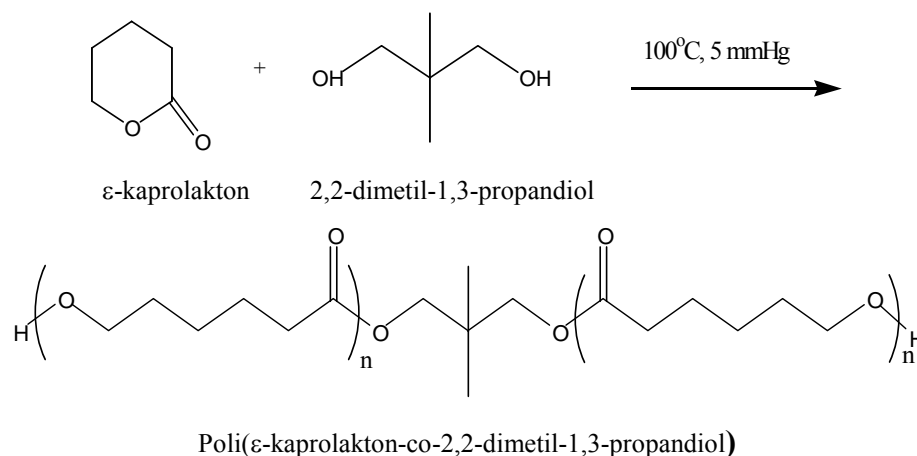
3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Sintesis Kopolimer

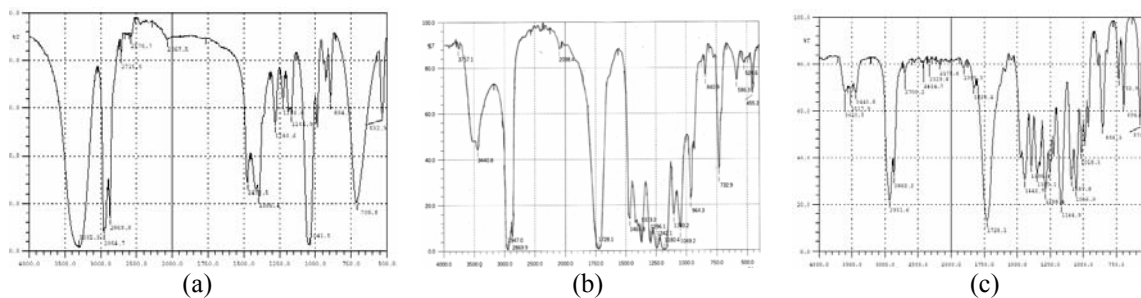
Jalur sintesis kopolimer poliester dapat dilihat pada gambar 3.

3.2. Struktur kopolimer

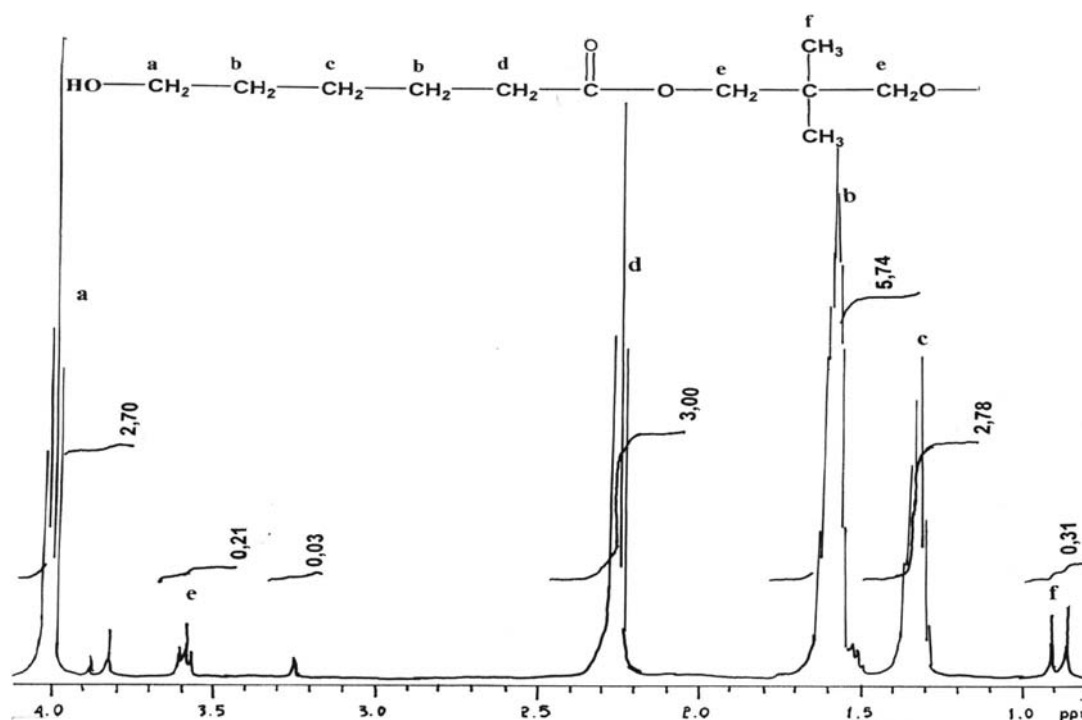
Secara kualitatif, hasil pengukuran spektra IR (Gambar 4) untuk kopolimer diperoleh data serapan sebagai berikut: 3440 cm⁻¹ (s, -OH);



Gambar 3. Reaksi pembentukan kopolimer dari monomer ϵ - kaprolakton dan 2,2- dimetil-1,3-propandiol



Gambar 4. Spektra- IR: a) 2,2-dimetil-1,3-propandioli b) ε-kaprolakton c) kopolimer poli(ε-kaprolakton-co-2,2-dimetil-1,3-propandioli)

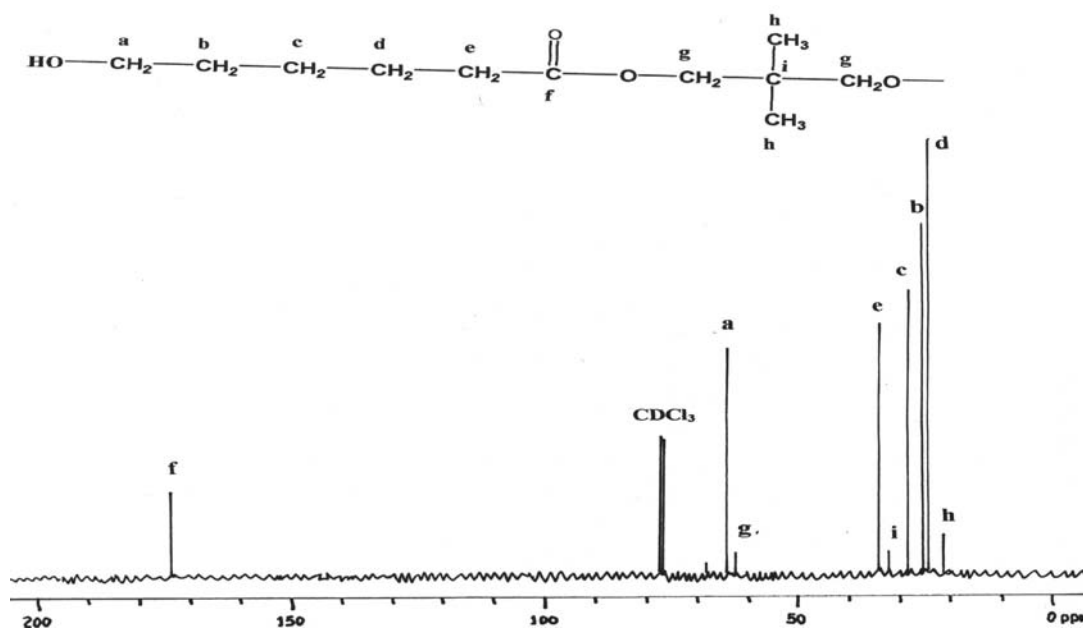


Gambar 5. Spektra NMR ¹H poli(ε-kaprolakton-co-2,2-dimetil-1,3-propandioli)

2954,7 , 2877,6 cm⁻¹ (s, C-H dari -CH₂-); 1728,1 cm⁻¹ (s, -C=O dari R-CO-O-R), 1473,5 cm⁻¹ (s, CH₃-C), 1396 cm⁻¹ (m, CH₃-C) dan 1180,4 cm⁻¹ (s, -CH₂-CO-O-R). Berdasarkan data serapan jelaslah bahwa telah terbentuk oligomer seperti reaksi pada gambar 1. Hal ini tampak pada serapan disekitar 3440 cm⁻¹ oleh gugus -OH, dimana terjadi intensitas serapan yang tajam untuk monomer 2,2-dimetil-1,3-propandioli. Akan tetapi setelah terbentuk kopolimer terjadi penurunan yang signifikan pada daerah tersebut. Terjadinya penurunan tersebut disebabkan gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa 2,2-dimetil-1,3-propandioli telah bereaksi dengan senyawa ε-kaprolakton membentuk kopolimer. Adapun serapan gugus -OH pada kopolimer dihasilkan oleh gugus -OH pada ujung rantai, dimana pada setiap rantai kopolimer terdapat dua gugus -OH (Gambar 4).

Terbentuknya kopolimer dapat dibuktikan melalui spektra NMR-¹H (Gambar 5) dan ¹³C (gambar 6). Berdasarkan spektra NMR-¹H di atas, terlihat adanya puncak serapan oleh bagian 2,2-dimetil-1,3-propandioli dan bagian ε-kaprolakton. Serapan yang dihasilkan oleh bagian 2,2-dimetil-1,3-propandioli terjadi pada δ : 0,86-0,93 ppm (m, C(CH₃)₂) dan 3,82-3,89 ppm (m, OCH₂), sedangkan bagian ε-kaprolakton memberikan serapan empat puncak yang sangat tajam pada δ: 1,25-1,40 (CH₂CH₂CH₂COO), 1,55-1,65 (OCH₂CH₂ dan CH₂CH₂COO), 2,20-2,35 (CH₂COO) dan 3,95-4,05 (OCH₂).

Pembentukan kopolimer juga diperkuat oleh data serapan NMR ¹³C (Gambar 6). Hal ini jelas terlihat adanya serapan oleh bagian 2,2-dimetil-1,3-propandioli dan ε-kaprolakton. Bagian 2,2-dimetil-1,3-propandioli memberikan tiga puncak

Gambar 6. Spektra NMR ^{13}C poli(ϵ -kaprolakton-co-2,2-dimetil-1,3-propanediol

Tabel 1. Komposisi monomer dan berat molekul kopolimer pada berbagai variasi komposisi monomer

No	Komposisi awal monomer ϵ -CL : NG	Komposisi monomer dalam Kopolimer ϵ -CL : NG	Berat Molekul Kopolimer
1	10 : 1	9 : 1	1130
2	20 : 1	17 : 1	2042
3	30 : 1	29 : 1	3410
4	40 : 1	36 : 1	4208
5	50 : 1	41 : 1	4778

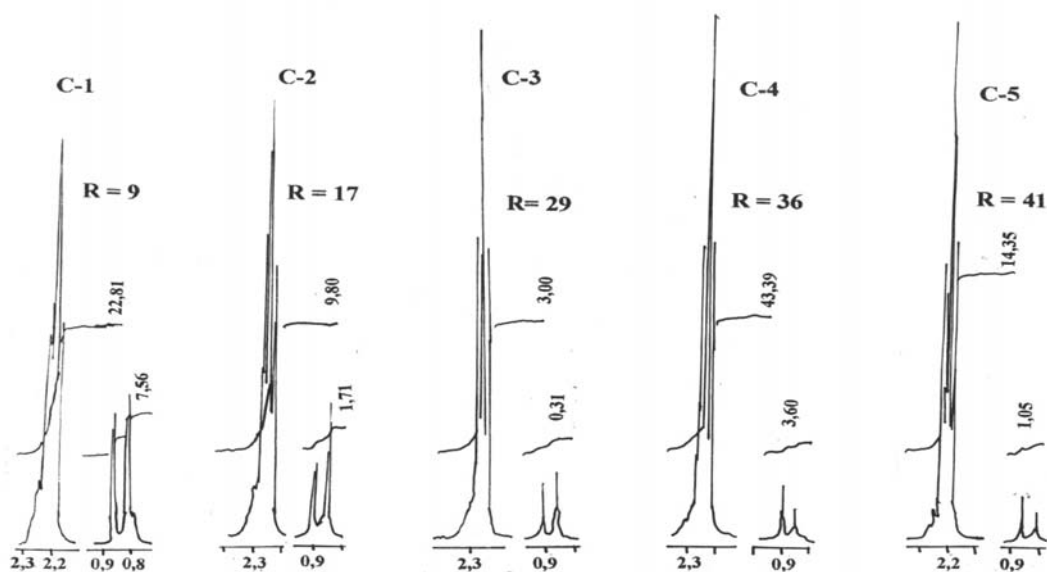
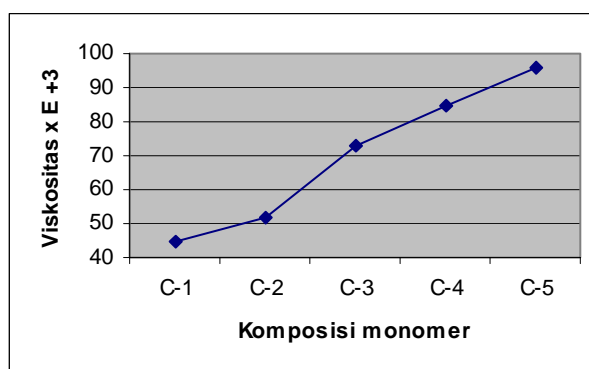
serapan yang dihasilkan masing-masing pada δ (ppm): 22,0 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 32,2 ($\underline{\text{C}}(\text{C}\text{H}_3)$), 62,5 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), adapun bagian ϵ -kaprolakton dihasilkan pada δ (ppm): 24,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 25,2 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28,3 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 64,1 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$) dan 173,5 ($\underline{\text{C}}\text{O}$).

3.3 Pengaruh komposisi monomer sebelum sintesis terhadap komposisi monomer dalam kopolimer

Komposisi monomer dalam kopolimer ditentukan dengan mengukur spektra NMR ^1H untuk sampel kopolimer pada berbagai variasi komposisi Gambar (7). Dengan menghitung rasio integrasi absorbansi salah satu puncak serapan proton bagian ϵ -kaprolakton dengan salah satu puncak serapan bagian 2,2-dimetil-1,3-propandiol pada berbagai variasi komposisi akan diperoleh data komposisi monomer dalam oligomer. Berdasarkan data komposisi dapat ditentukan berat molekul. Dalam hal ini puncak serapan yang dipilih ialah pada $\delta = 0,8-0,9$ ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) untuk bagian 2,2-dimetil-1,3-propandiol dan $\delta = 2,20-2,35$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COO}$) dari bagian ϵ -kaprolakton.

Hasil perhitungan komposisi dan berat molekul kopolimer selengkapnya dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan tabel 1, tampak bahwa semakin banyak monomer ϵ -kaprolakton dalam campuran monomer sebelum sintesis, maka kandungan senyawa tersebut dalam kopolimer semakin meningkat hingga perbandingan mol 40:1. Akan tetapi pada perbandingan mol awal 50:1, peningkatan kandungan senyawa lakton hanya sekitar 50% dari campuran monomer awal. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: mekanisme pembentukan kopolimer berlangsung dalam dua tahap. Tahap pertama terjadi reaksi antara monomer ϵ -kaprolakton dan 2,2-dimetil-1,3-propandiol hingga semua monomer diol habis bereaksi. Tahap ke dua ialah terjadi perpanjangan rantai oleh monomer ϵ -kaprolakton pada setiap ujung rantai. Perpanjangan rantai terus berlangsung efektif hingga batas komposisi tertentu. Pada komposisi yang lebih besar, yakni 50:1, penambahan panjang rantai menjadi berkurang. Hal ini terkait dengan kereaktifan

Gambar 7. Spektra NMR ^1H kopolimer pada berbagai komposisi monomer

Gambar 8. Kurva hubungan komposisi monomer terhadap viskositas kopolimer

polimer, dimana semakin panjang rantai polimer yang terbentuk kereaktifannya juga berkurang

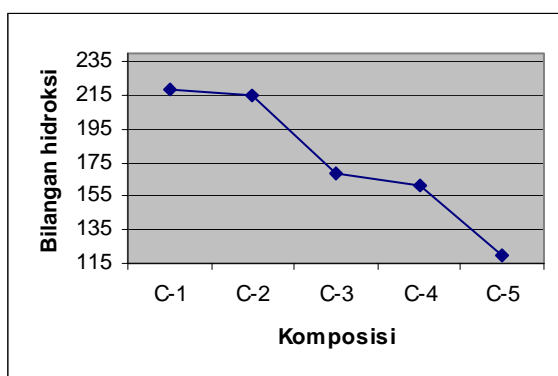
3.2.2 Pengaruh komposisi monomer terhadap bilangan hidroksi dan viskositas oligomer

Data hubungan antara komposisi monomer dengan viskositas dan bilangan hidroksi polimer berturut-turut dapat dilihat pada gambar 8 dan gambar 9. Berdasarkan data pada gambar 8 tampak bahwa semakin tinggi fraksi mol monomer ϵ - kaprolakton dalam polimer maka viskositas polimer terjadi peningkatan. Hasil ini didukung oleh data bilangan hidroksi (gambar 9) dan berat molekul, dimana bilangan hidroksi kopolimer menurun seiring dengan meningkatnya fraksi mol monomer ϵ - kaprolakton. Hal ini berarti bahwa terjadi reaksi pembentukan blok kopolimer. Semakin besar fraksi mol monomer ϵ - kaprolakton maka rantai polimer yang terbentuk semakin panjang. Bertambahnya panjang rantai

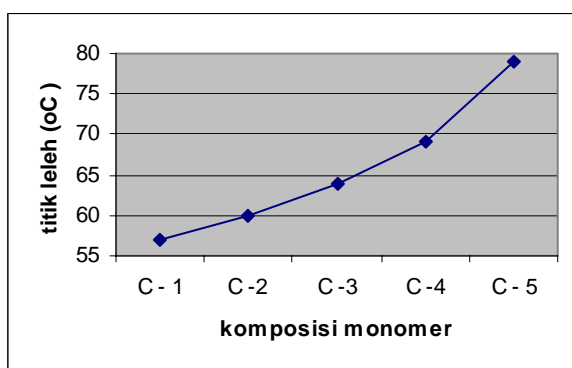
molekul polimer menyebabkan jumlah rantai polimer semakin menurun, sehingga jumlah gugus hidroksi juga menurun karena pada pembentukan kopolimer blok antara monomer ϵ - kaprolakton dan neopentilgliserol diasumsikan hanya terdapat dua gugus hidroksi untuk setiap rantai. Hal ini didukung oleh data bilangan hidroksi yang cenderung menurun seiring dengan meningkatnya kandungan monomer ϵ - kaprolakton dalam kopolimer. Panjang rantai suatu molekul polimer juga terkait dengan berat molekul dan viskositas, dimana semakin panjang rantai molekul polimer maka viskositas dan berat molekulnya juga semakin meningkat. Hasil ini juga sesuai dengan data viskositas (Gambar 8).

3.2.3 Pengaruh komposisi monomer terhadap sifat termal oligomer

Titik leleh polimer meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah mol monomer ϵ -



Gambar 9. Kurva hubungan komposisi monomer terhadap bilangan hidroksi



Gambar 10. Kurva hubungan antara komposisi monomer terhadap titik leleh Kopolimer

kaprolakton dalam polimer (gambar 10). Hal ini berarti bahwa rantai polimer bertambah panjang dengan bertambahnya kandungan monomer ϵ -kaprolakton yang mempengaruhi kenaikan berat molekul, sehingga sifat termal polimer semakin tinggi.

4. Kesimpulan

Reaksi pembentukan oligomer antara monomer ϵ -kaprolakton dan neopentil glikol telah berlangsung. Hasilnya yaitu terbentuknya kopolimer blok, dimana semakin besar jumlah mol monomer ϵ -kaprolakton maka rantai oligomer yang terbentuk semakin panjang. Kandungan monomer lakton dalam kopolimer yang terbentuk semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kandungan monomer

tersebut dalam campuran awal monomer sebelum sintesis. Titik leleh dan viskositas oligomer yang terbentuk semakin tinggi seiring dengan bertambah besar jumlah mol ϵ -kaprolakton, sedangkan bilangan hidroksi menurun dengan meningkatnya jumlah mol monomer tersebut.

5. Daftar Pustaka

Considine, W.J., and Gerald, A.B, (1965), The NMR Spektra of a Distannoxane, *J. Organometal Chem.*, 3 308-313.

Doi, Y., Tanahasyi, N., (1991), The Chemical Synthesis of P (3HB) by ring-opening Polymerization of α - or (S) β -D-L-Butyrolactone, *Macromolecules*, 27, 3139-3146

Findley, R.H., and White, D.C.,(1983). *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 71

Hori, J., Suzuki, M., Okeda, Y., Imai, T., Sakaguchi, M., Takahasyi, Y., Yamaguchi, A., and Akutagawa, S., (1992), A Novel Biodegradable Poly(Urethane Esther) Synthesized from Poly(3-hydroxybutyrate) Segments, *Macromolecules*, 25, 5117 – 5118.

Hiltunen, K., Harkonen, M., Seppala, J.V., and Vaananen, T., (1996), Synthesis and Characterization of Lactic acid based telechelic prepolymers, *Macromolecules*, 29, 8677 – 8682.

John, D.B., Lenz, R.W., Luick, A., (1984), Ring opening polimerization; Ivin, K.J., Saegusa, T., Eds; *Elsevier Appl. Sci. Pbl.*; London, 1, 7, 461

Kylma, J., (2001), Lactic acid based Poly(Esther-Urethane) – Modification via copolymerization, chain linking and blending, *Dissertation*, Univ. of Tech. Espoo, Finland

Lori, A.H., Yuri, Y.S., and Richarde, A.G.,(1996), Enzyme-Catalyzed Polimerizations of ϵ -aprolactone: effect of initiator on product strukture, propagation kinetics, and mechanism *Macromolecules* , 29, 7759-7766.

Lundber, R.D., and Cox, E.F., (1969), *Ring Opening Polymerization* , Marcel Dekker, New York.



Application of QSAR Models in Database Mining: Predicting Anti Tuberculosis Activity of Plant Terpenoids.

Mohamed Noor Hasan and Neni Frimayanti

Department of Chemistry, Faculty of Science
Universiti Teknologi Malaysia, 81310 UTM Skudai, Johor, Malaysia
e-mail: mnoor@kimia.fs.utm.my

Abstract

Due to drug resistant problems, there is an urgent need to discover and develop new anti-tuberculosis lead compounds. In this study, quantitative structure-activity relationship (QSAR) models have been used to discover and predict the anti-tuberculosis activity of chemical compounds from a large database. The approach begins with the development of rigorously validated QSAR models obtained using genetic algorithm-partial least square (GAPLS) and multiple linear regression analysis (MLRA) methods. The data set used in model development consists of 122 plant terpenoids with moderate to high activity against *Mycobacterium tuberculosis*. The QSAR models were applied to mining chemicals in a database consisting of 3319 compounds. The degree of similarity (based on Euclidean distance) between active compounds in data set and those in the database was calculated using the same set of descriptors used in the QSAR models. A total of 18 compounds were short-listed. By applying the applicability domain criterion the number of possible candidates could be further narrowed down. Finally, the biological activity of these compounds were calculated and predicted to be active anti-tuberculosis, i.e. with minimum inhibition concentration of less than 62.5 μ g/mL.

Keywords: QSAR, anti tuberculosis, plant terpenoids, database mining, applicability domain

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is a disease mainly caused by pathogen bacteria called *Mycobacterium tuberculosis*. It can affect several organs of human body, including the brain, kidney and bones but most commonly affects the lungs. The recent increase in the number of multi-drug resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* has created an urgent need for discovery and development of new anti tuberculosis lead compounds (Cantrell, *et al.*, 2001). There are many approaches in the development of new compounds that exhibit certain biological activities. In this paper we present a method based on application of quantitative structure activity relationship (QSAR) models to screen a large chemical database. Results of the screening process can be used to propose lead molecules for generation of new drugs.

In a typical structure-activity relationship study, one is interested to develop models that can correlate the structural features of a series of chemical compounds with their physicochemical properties or biological activities (Grodnitzky, *et al.*, 2002, Leach and Gillet, 2003). Based on the premise that activity is related to the structure, these models can be used to predict the activity of compounds not included in the model development stage.

In this study, we have developed QSAR models correlating structural characteristics of some plant terpenoids with their anti tuberculosis activities. The models were then applied in database mining of a large chemical database to select a set of probable active compounds. This approach can be generalized as a drug discovery tool and applied to a variety of available data sets of biologically active compounds.

2. Research Methodology

QSAR modelling of Plant terpenoids. Data of bioactive compounds from the literature (Cantrell, *et al.*, 2001) were used to construct the QSAR model. The data set consists of 122 plant terpenoids with their minimum inhibition concentration (MIC, $\mu\text{g/mL}$) against *Mycobacterium tuberculosis*. The data set was divided into training set (61 compounds) for model development and prediction set (61 compounds) for model validation. Training set selection was performed by first sorting the list in increasing value of biological activity. Next the odd numbered compounds were assigned to the training set and the even numbered compounds were assigned to the prediction set. ChemDraw 6.0 (Cambridge Soft) was used to draw the molecular structure of each compound and model generation was carried out by using TSAR 3.3 software package (Accelrys).

Genetic algorithms technique was applied to select the best subset of descriptors to be included in the models. Partial least square (PLS) and multiple linear regression analysis (MLRA) techniques were used to generate the models (Beebe, *et al.*, 1998, Daren, 2001). The best QSAR models developed were validated by predicting MIC value of compounds in the prediction set.

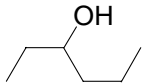
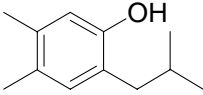
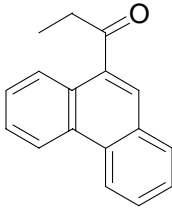
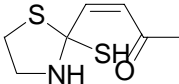
Application of QSAR Models to Database Mining. Thirty-two compounds with strong anti tuberculosis activity (MIC less than $62.5 \mu\text{g/mL}$) were selected as the similarity probes for database mining. Molecular descriptors were calculated for the probes as well as for the 3319 compounds taken from the Amicbase antimicrobials database (Review Science, 2004). Only descriptors that appeared in the QSAR model need to be calculated. The similarity is characterized by Euclidean distance between compounds in the multidimensional space.

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{n=1}^N (X_{in} - X_{jn})^2} \quad (1)$$

where d_{ij} is the distance between any two compounds, X_{in} and X_{jn} are the values of n th descriptor for compounds i and j . Compounds which were very similar to the active probes (smallest distance) were considered as hits and can be further investigated.

Applicability Domain of QSAR Models. The concept of applicability domain or similarity threshold that is specific to each particular QSAR model has been applied to database mining (Shen *et al.*, 2004) to avoid making prediction for compounds that differ substantially from the training set molecules. Similarity threshold was

Table 1. Consensus hits from database mining with predicted MIC

Compound	Structure	Predicted MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Ethylbutanol		48.8
2-isobutyl-4,5-dimethyl-phenol		24.2
1-phenanthren-9-yl-propan-1-one		12.7
Cis-4-(2-mercaptothiazoliny) 3-buten-2-one		40.9

calculated as follows:

$$D_T = \bar{y} + Z\sigma \quad (2)$$

where \bar{y} is the average Euclidean distance between each compound, σ is the standard deviation of these Euclidean distances, and Z is an arbitrary parameter to control the significance level (0.5). If the distance of a particular compound from the probe molecule is less than this threshold value, the prediction is considered reliable.

3. Results and Discussion

QSAR Modelling of Plant Terpenoids. The QSAR models were generated using MLRA and GA-PLS methods. The best model developed using multiple linear regression analysis (MLRA) technique has r^2 value of 0.77 and r^2 (CV) of 0.72, while the combination of partial least square (PLS) and genetic algorithm (GA) produced a model with r^2 value of 0.81 and r^2 (CV) of 0.80. The statistics indicated that PLS model was slightly better; nevertheless both could be used as predictive models in the database mining.

Database Mining. In the first round of screening, compounds in the database with Euclidean distance of 0.5 units from the probes were selected as initial hits. A total of 36 compounds were included in the list. The initial list was further refined by selecting consensus hits, i.e. molecules that consistently appeared in both models, reducing the candidates to 18 compounds.

The anti tuberculosis activity of these 18 consensus hits were predicted by using the best QSAR models. Each of these models has its own applicability domain and by applying this criterion the number of hits was reduced to only four compounds. All of these compounds were predicted to have high anti tuberculosis activities as shown in Table 1.

4. Conclusions

Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) approach can be used to develop model

with high predictive power to predict the activity of compounds that are not included in the training set. Very good models that correlate structural descriptors with anti tuberculosis activity have been developed by using genetic algorithm-partial least square (GA-PLS) and multiple linear regression analysis (MLRA) techniques. The application of these models in database mining has enabled us to select potential lead compounds for development as new anti tuberculosis drugs. The list can be further refined by restricting to compounds which were similar in structure to those in the training set.

5. Acknowledgement

We thank Universiti Teknologi Malaysia and the Ministry of Science, Technology and Innovation for financial support through IRPA Grant No. 09-02-06-0071-EA208.

6. References

- Beebe, K. R., Pell, R. J., Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics, a Practical Guide*. Willey Interscience. New York. 278-288.
- Cantrell, C. L., Franzblau, S. G., and Fischer, N. H. (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* **67**, 685-694.
- Daren, Z. (2001). QSPR Studies of PCBs by the Combination of Genetic Algorithm and PLS Analysis. *Computer and Chemistry*. **25**, 197-204.
- Groditzky, J.A. and Coats, J.R. (2002). QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4576-4580.
- Leach, A. R., Gillet, V. J., (2003). *An Introduction to chemoinformatics*, Kluwer Academic, London, 77-101.
- Review Science (2004) Amicbase: Database on Antimicrobials. Retrieved on 8th October 2004 from <http://www.reviewscience.com/Compounds.htm>
- Shen, M., Beguin, Cecile., Golbraikh, A., Stables, J. P., Kohn, H., Tropsha, A. Application of Predictive QSAR Models to Database Mining: Identification and Experimental Validation of Novel Anticonvulsant Compounds *J. Med. Chem.* **47**, 2356-2364.

Esterifikasi Asam Monooleat dan Sorbitol dengan katalis Asam Sulfat

Mahfud¹⁾, Nanik Nurcahyani¹⁾, Naili Sofianingsih¹⁾ dan Lik Anah²⁾

1) Jurusan Teknik Kimia, FTI-ITS
Kampus ITS Sukolilo Surabaya 60111, Indonesia
E-mail: mahfud_its@hotmail.com
2) Pusat Penelitian Kimia – LIPI
Jalan Cisit -Bandung 40135, Indonesia
e-mail: likanah@yahoo.com

Abstrak

Salah satu surfaktan yang banyak digunakan adalah sorbitan monooleat, yang dapat diperoleh melalui proses esterifikasi antara sorbitol dan asam oleat. Adanya air sebagai hasil samping dari proses esterifikasi ini dapat menyebabkan kesulitan – kesulitan dalam memperoleh sorbitan monooleat. Hal ini dapat diatasi dengan distilasi reaktif. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari kinetika reaksi esterifikasi asam oleat dengan sorbitol menggunakan H_2SO_4 sebagai katalisator melalui distilasi reaktif, dan mempelajari pengaruh suhu, komposisi reaktan, dan konsentrasi katalis terhadap konversi reaksi esterifikasi. Percobaan dilakukan dalam reactor batch (labu leher tiga) dengan kondisi operasi : tekanan atmosferik, pengadukan konstan. Percobaan dilakukan dengan memvariasi temperatur, rasio molar sorbitol dengan asam oleat, dan konsentrasi katalis. Proses esterifikasi dilakukan selama 60 menit. Ester yang terbentuk ditentukan melalui analisa bilangan asam, dan skala warna, yang dilakukan sampling setiap periode waktu tertentu. Dari penelitian diperoleh hasil bahwa konversi reaksi akan meningkat dengan naiknya temperatur operasi, rasio molar sorbitol dengan asam oleat, serta konsentrasi katalis. Reaksi esterifikasi mengikuti reaksi reversibel order satu terhadap masing – masing reaktan.

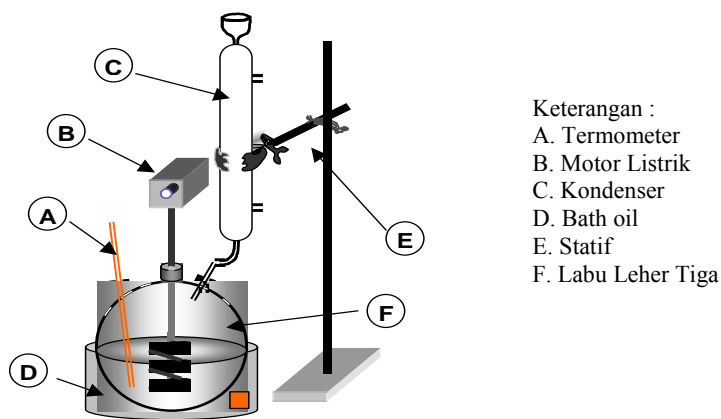
Kata kunci : sorbitan monooleat, esterifikasi, destilasi reaktif

1. Pendahuluan

Sorbitan monooleat adalah bahan kimia dalam kelompok surfaktan yang banyak digunakan pada industri – industri seperti : kosmetik (emulsifier), farmasi (pelarut obat), dan tekstil (dispersi zat warna kain). Di Indonesia kebutuhan surfaktan selama ini masih dipenuhi dari impor sebanyak 44.500 ton (Anonim, 2000) dan diprediksi jumlah impor tersebut setiap tahunnya terus berkembang sejalan dengan tumbuhnya industri kosmetik, industri makanan, industri minuman, industri farmasi, industri tekstil dan industri kulit. Fenomena ini memberi arti bahwa peluang menggantikan impor surfaktan terbuka lebar dan kegiatan penelitian untuk bahan kimia surfaktan menjadi perlu dilakukan. Hal ini didukung oleh bahan baku untuk proses pembuatan surfaktan yang bersifat renewable resources yang tersedia

di Indonesia dan terjamin keberadaannya. Sebagai contoh untuk proses esterifikasi surfaktan sorbitan monooleat dihasilkan dari reaksi kimia antara sorbitol dan asam oleat (berbasis tanaman sawit), dengan demikian dari hal bahan baku dapat dipenuhi secara lokal.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa fatty acid ester sorbitan sebagai surfaktan menggunakan fatty acid jenis phosphorus oxyacid dan katalis berbasis metal (Hunter et.al.1990) Pada proses perbaikan performance yang berkaitan dengan produk-produk kertas menggunakan sorbitan monostearat dimana jenis fatty acidnya adalah asam stearat, sedangkan untuk proses perbaikan performance yang berkaitan dengan warna dan sifat dispersi pada produk-produk plastik menggunakan pigmen dari bahan logam atau ammonium monoazo (Johnson



Keterangan :
 A. Termometer
 B. Motor Listrik
 C. Kondenser
 D. Bath oil
 E. Statif
 F. Labu Leher Tiga

Gambar 1. Peralatan percobaan Esterifikasi

& Johnson, 1983, William & Greig, 1987). Riset sorbitan ester untuk pencucian bahan keratin dibuat dari fatty acid C8-C30 dengan ethylene oxide dilakukan oleh Sandrine et.al.(1987).

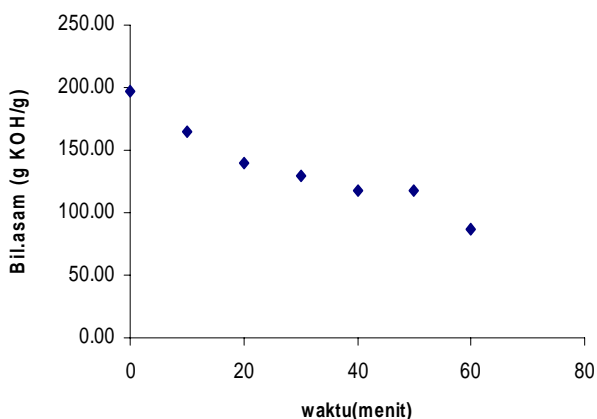
Sedangkan mengenai data kinetika esterifikasi homogen dari asam lemak bebas (fatty acids) relatif jarang di literatur. Pada awal tahun 1980-an, Zou et. al. (1984) menentukan data kinetik esterifikasi asam oleat dengan metanol dengan metode semibatch. Zaidan et.al.(1986)

mempelajari proses operasi asam oleat dengan berbagai alkohol ringan dan mengusulkan model simulasi untuk menentukan kondisi operasi optimal. Kinetika esterifikasi asam oleat dan campuran asam lemak bebas dieksplorasi oleh Unitthan and Tiwari (1987), yang menunjukkan bahwa katalis PTSA (Para Toluene Sulfonic acid) lebih baik dari pada katalis asam sulfat Bart et.al (1994) mempelajari kinetika asal leuvinat dengan n-butanol dengan katalis PTSA.

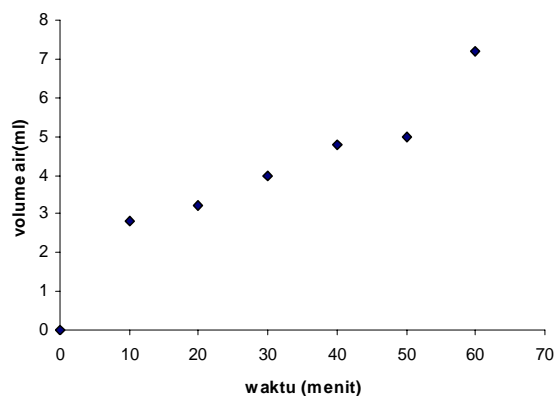
Ester sorbitan monooleat dapat dibentuk

Tabel 1 Data Bilangan asam dan volume air pada temperatur 130 °C, sorbitol : asan oleat 1:1, dan konsentrasi katalis 1%

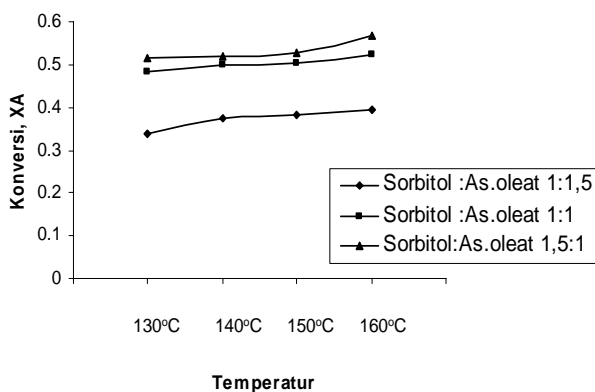
Waktu (menit)	Bilangan Asam (gKOH/g)	Volume Air (ml)
0	197,552	0
10	163,98	2,8
20	139,00	3,2
30	129,48	4,0
40	118,25	4,8
50	117,47	5,0
60	86,35	7,2



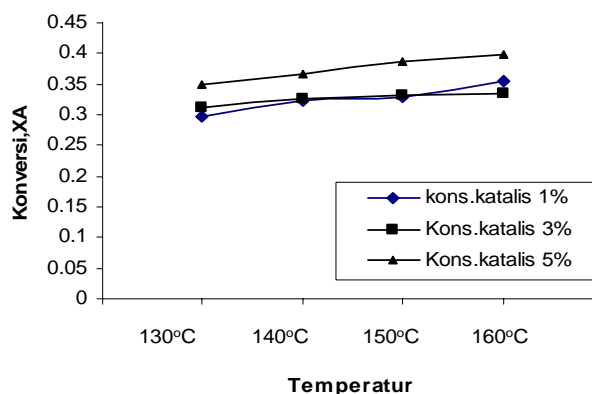
Gambar 2. Hubungan antara bilangan asam dan waktu (130°C, sorbitol : asam oleat 1:1, H₂SO₄ 1%)



Gambar 3 Hubungan volume air terhadap waktu reaksi (130°C, sorbitol : asam oleat 1:1, H₂SO₄ 1%)

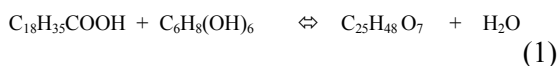


Gambar 4 Pengaruh temperatur terhadap konversi reaksi (konsentrasi H₂SO₄ 5%)



Gambar 5 Pengaruh temperatur terhadap konversi reaksi (komposisi reaktan 1:1)

langsung dari reaksi esterifikasi antara asam karboksilat (asam oleat) dan sorbitol dengan katalis yang homogen. Reaksi ini berlangsung lambat dan reversibel dengan persamaan reaksi seperti berikut :



Untuk kebutuhan memproduksi surfaktan sorbitan monooleat maka diperlukan data-data kinetika reaksi esterifikasi asam oleat dengan sorbitol. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari kinetika proses esterifikasi surfaktan sorbitan monooleat dari sorbitol dan asam monooleat dengan menggunakan katalis PTSA

2. Metodologi Penelitian

2.1 Peralatan Percobaan

Peralatan eksperimen terdiri dari labu leher tiga pyrex dengan volume 1 liter, yang dipasang dengan reflux kondensor untuk mencegah kehilangan produk dan dilengkapi dengan termometer untuk mengetahui suhu reaksi. Sebuah pengaduk kaca type anchor yang digerakkan oleh motor pengaduk digunakan untuk mencapai homogenitas campuran (Gambar 1). Suhu reaktan dijaga konstan dengan menggunakan pengatur oil bath.

2.2 Prosedur Percobaan

Sorbitol dan PTSA disikan kedalam reaktor pada perbandingan tertentu dan asam monooleat dimasukkan kedalam corong tetes (dropping funnel). Setelah suhu yang diinginkan tercapai, asam monooleat dialirkan kedalam reaktor. Saat tersebut dipandang sebagai awal dari waktu reaksi. Sample reaktan (kurang lebih 5 ml) diambil melalui pipet setiap periode waktu tertentu (5 – 10 menit) untuk dianalisa kandungan

sorbitan monooleat yang terbentuk (bilangan asamnya).

2.3 Kondisi operasi dan Variabel penelitian :

Tekanan : atmosferik (1 atm)

Suhu : 180 °C.

Ratio sorbitol/asam asetat : 0,1 ; 1 ; 10

Konsentrasi katalis PTSA : 2,5% ; 5 %; 7,5 %; 10 %

3. Hasil dan Pembahasan

Langkah awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan karakterisasi asam oleat dan sorbitol yang digunakan dalam penelitian ini. Asam oleat yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai densitas 0,8957 gram/ml, bilangan asam sebesar 197,552 gram KOH per gram, bilangan penyabunan sebesar 99,418 gram KOH / gram, warna (D-1500) sebesar 2 dan viskositas sebesar 3,35 cP. Sorbitol yang digunakan mempunyai densitas sebesar 1,3157 gram / ml, dan viskositas sebesar 23,2823 cP. Pada proses esterifikasi, dilakukan pengambilan sampel setiap selang waktu 10 menit selama satu jam reaksi dan dianalisa perubahan konsentrasi asam oleat (bilangan asam)

3.1. Pengaruh Temperatur

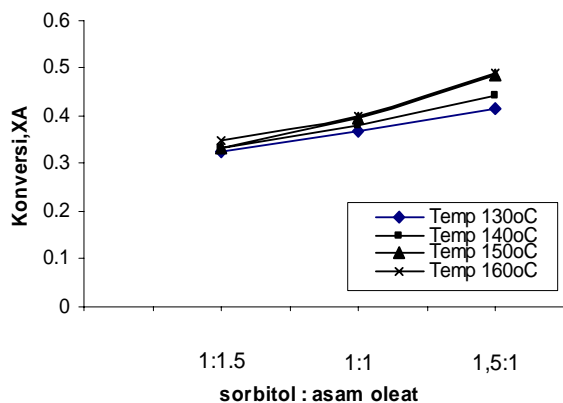
Penelitian ini dilakukan pada variasi temperatur 130, 140, 150, dan 160 °C. Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa semakin tinggi temperatur yang digunakan, maka semakin besar sorbitan monooleat yang diperoleh. Hal ini terlihat dengan adanya peningkatan konversi pada setiap kenaikan konsentrasi produk yang dihasilkan. Pada komposisi reaktan 1:1, dan konsentrasi katalis 1% dapat diketahui bahwa konversi reaksi 60 menit pada temperatur 130 °C sebesar 0,2964, temperatur 140 °C sebesar 0,3222, temperatur 150 °C sebesar 0,3297, dan pada temperatur 160 °C sebesar 0,3542. Kenaikan ini walaupun sangat

kecil tetapi tampak bahwa dengan adanya kenaikan temperatur akan menaikkan konversi pada berbagai rasio molar sorbitol : asam oleat seperti pada gambar 4, pada berbagai konsentrasi katalis seperti tampak pada gambar 5.

Sebagai mana telah diketahui bahwa temperatur berpengaruh terhadap kecepatan reaksi esterifikasi, mengikuti persamaan Arrhenius : $k = k_0 \text{Exp} (-E/RT)$. Dari persamaan ini tampak bahwa semakin besar temperatur maka semakin besar harga tetapan kecepatan reaksi sehingga semakin besar sorbitan monooleat yang dihasilkan. Selain itu jika ditinjau dari segi kinetika molekuler, peningkatan temperatur akan mempengaruhi peningkatan tumbukan – tumbukan antar molekul reaktan. Peningkatan tumbukan – tumbukan antar molekul reaktan akan memungkinkan semakin besarnya konversi asam oleat dan sorbitol menjadi sorbitan monooleat. Hal ini menyebabkan asam yang terkonversi menjadi sorbitan monooleat semakin tinggi.

3.2. Pengaruh Komposisi Reaktan

Komposisi reaktan (molar sorbitol : molar asam oleat) yang diteliti adalah 1:1 ; 1:1,5 ; 1,5:1. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa semakin besar rasio molar sorbitol dengan asam oleat, menyebabkan jumlah sorbitan monooleat yang terbentuk semakin semakin besar. Hal ini terlihat dengan adanya peningkatan konversi yang diperoleh pada setiap kenaikan rasio molar sorbitol dengan asam oleat. Pada temperatur operasi 130°C, konsentrasi katalis (H₂SO₄) 1%, menunjukkan bahwa pada rasio molar sorbitol : asam oleat 1:1 tercapai konversi di akhir reaksi sebesar 0,3147, pada rasio molar sorbitol :asam oleat 1:1,5 tercapai konversi di akhir reaksi sebesar 0,4041, dan pada rasio molar sorbitol : asam oleat 1,5:1 tercapai konversi pada akhir reaksi sebesar 0,4025. Kenaikan ini walaupun



Gambar 6. Pengaruh Komposisi reaktan terhadap konversi reaksi (H₂SO₄ 3%)

sangat kecil tetapi tampak bahwa dengan adanya kenaikan rasio molar sorbitol : asam oleat akan menaikkan konversi pada berbagai temperatur reaksi seperti pada gambar 6., dan pada berbagai konsentrasi katalis seperti tampak pada gambar 7.

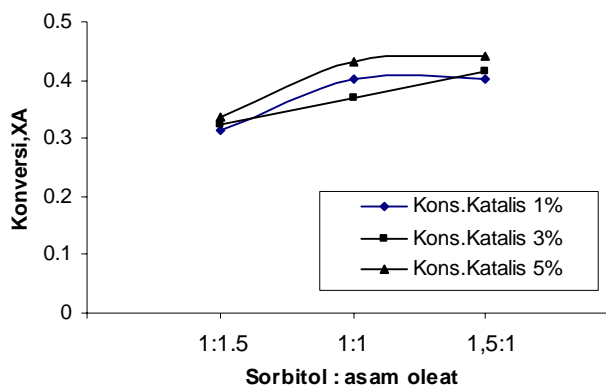
3.3. Pengaruh Konsentrasi Katalis

Konsentrasi katalisator yang diteliti adalah 1%, 3%, 5% terhadap mol sorbitol. Dari hasil penelitian ini ternyata konsentrasi katalisator yang semakin besar, menyebabkan jumlah sorbitan monooleat yang terbentuk semakin besar, hal ini terlihat dengan adanya peningkatan konversi pada setiap kenaikan konsentrasi produk yang dihasilkan. Pada temperatur operasi 130 °C, komposisi reaktan 1:1,5 terlihat bahwa pada konsentrasi 1% tercapai konversi di akhir reaksi sebesar 0,4332, pada konsentrasi 3 % tercapai konversi 0,4389 di akhir reaksi dan pada konsentrasi 5% tercapai 0,4411. Kenaikan ini walaupun sangat kecil tetapi tampak bahwa dengan adanya kenaikan konsentrasi akan menaikkan konversi pada berbagai temperatur reaksi seperti pada gambar 8, dan pada berbagai komposisi reaktan seperti tampak pada gambar 9.

Jumlah katalis yang digunakan dalam reaksi esterifikasi asam oleat dan sorbitol menjadi sorbitan monooleat sangat mempengaruhi hasil perolehan. Hal ini disebabkan karena konstanta kecepatan reaksi dipengaruhi oleh konsentrasi katalisator, yaitu konsentrasi ion hidrogen, semakin tinggi konsentrasi ion hidrogen maka semakin tinggi kecepatan reaksinya sehingga konversi reaksi semakin besar.

3.4 Kinetika Reaksi

Untuk memudahkan penulisan rumus dalam kecepatan reaksi kimia maka persamaan reaksi



Gambar 7. Pengaruh Komposisi reaktan terhadap konversi reaksi (T= 130 °C)

kimia diatas ditulis sebagai berikut :

- dimana : [A] = konsentrasi asam oleat
 [B] = konsentrasi sorbitol
 [C] = konsentrasi sorbitan monooleat
 [D] = konsentrasi H₂O

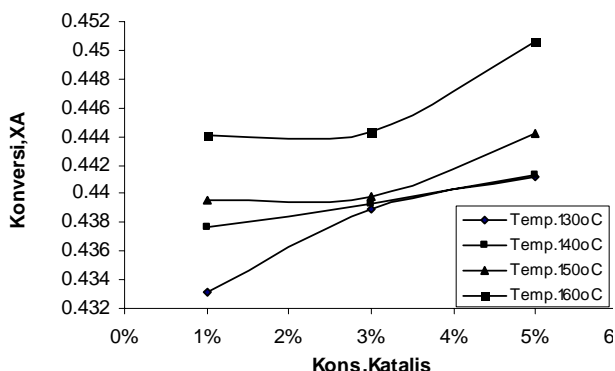
Laju reaksi pembentukan sorbitan monooleat dinyatakan dengan persamaan berikut :

$$r_c = k_1 [A]^a [B]^b - k_2 [C]^c [D]^d$$

Untuk menentukan konstanta – konstanta kinetika reaksi, digunakan metode integral dengan pencocokan parameter (fitting parameter) seperti berikut. Setelah waktu reaksi dan konsentrasi asam monooleat dibuat grafiknya, kemudian dibandingkan dengan kurva yang telah diketahui orde dan kecepatan reaksinya (model kinetiknya). Kemudian selisih antara data experimental dan data hasil perhitungan yang menggunakan model kinetika diminimumkan dengan metode optimasi, sehingga diperoleh harga konstanta – konstanta kinetika.

Untuk itu diusulkan :

- Order reaksi ke arah kanan : a = b = 1
 Order reaksi ke arah kiri : c = d = 1



Gambar 8 Pengaruh konsentrasi katalis terhadap konversi reaksi (komposisi reaktan 1:1,5)

Untuk mengestimasi laju reaksi, beberapa konsiderasi berikut dilakukan :

Keadaan kesetimbangan yang terjadi ketika kecepatan mendekati nol dan dinyatakan dengan hukum aksi massa sebagai berikut :

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Dimana K adalah konstanta yang mencirikan kesetimbangan reaksi.

Persamaan neraca massa dalam reaktor batch dengan persamaan kecepatan reaksi yang diusulkan untuk sistem diatas dinyatakan dengan :

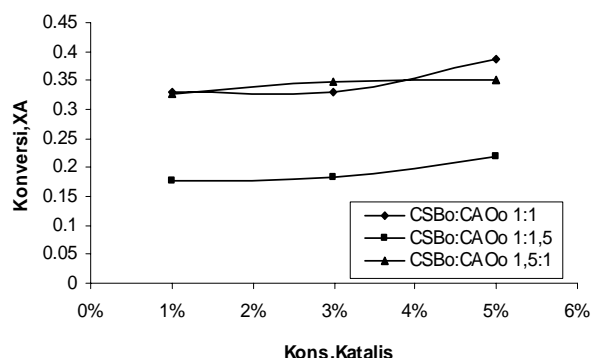
$$dC/dt = k_1[A][B] - k_2[C][D]$$

$$[A] = [A]^o - [C]$$

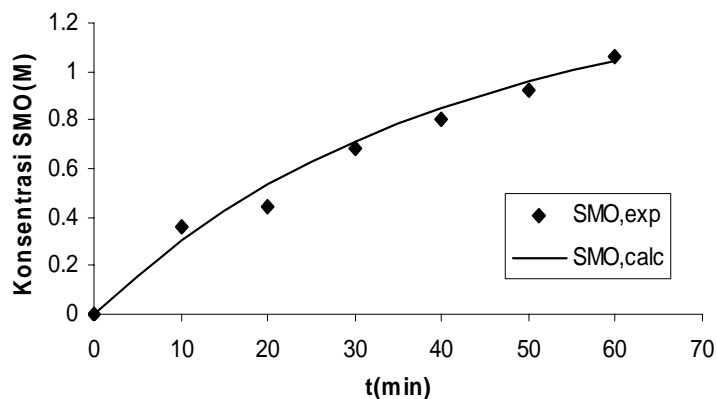
$$[B] = [B]^o - [C]$$

$$[C] = [D]$$

akan menjadi :



Gambar 9 Pengaruh konsentrasi katalis terhadap konversi reaksi (temperatur 150 °C)



Gambar 10 Perbandingan data percobaan dan data hasil perhitungan dengan model kinetika (50°C, komposisi reaktan 1:1,5, katalis 3%)

$$dC/dt = k_1([A]^0 - [C]) ([B]^0 - [C]) - k_2[C]^2$$

dengan mengintegrasikan dC/dt akan menghasilkan persamaan berikut (Bart, 1994) :

$$[C] = \frac{\{e^{(-\Delta)^{1/2}} - 1\}(k_1^2([A]^0 - [B]^0)^2 - \Delta)}{\{2(k_1 - k_2)[k_1([A]^0 + [B]^0) + (-\Delta)^{1/2}]e^{(-\Delta)^{1/2}} - (k_1([A]^0 + [B]^0) - (-\Delta)^{1/2})\}}$$

dimana : $\Delta = 4(k_1 - k_2)k_1[A]^0[B]^0 - k_1^2([A]^0 - [B]^0)^2$

Persamaan diatas digunakan untuk menghitung konsentrasi sorbitan monooleat setiap saat untuk mendapatkan harga – harga konstanta kecepatan reaksi.

Gambar 4.9 menunjukkan perbandingan antara data – data hasil percobaan dan data hasil perhitungan menggunakan persamaan diatas. Dari gambar 4.9 menunjukkan kesesuaian antara model kinetika yang diusulkan dengan data – data eksperimen yang diperoleh. Dengan demikian proses esterifikasi asam oleat dan sorbitol mengikuti reaksi reversibel order satu terhadap masing – masing reaktan.

Sedangkan warna dari sorbitan monooleat yang diperoleh dipengaruhi temperatur reaksi. Semakin tinggi temperatur reaksi yang digunakan, semakin pekat warna yang dihasilkan. Dalam literatur diperoleh bahwa warna dari asam oleat jika diukur dengan metode ASTM D-1500 adalah sebesar 8. Jika dibandingkan dengan data yang diperoleh dari hasil eksperimen menunjukkan hasil yang berbeda. Hal ini dikarenakan untuk memperoleh warna sebesar 8 diperlukan waktu reaksi selama 12-15 jam. Sedangkan waktu reaksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah selama 1 jam. (Porter, 1994).

4. Kesimpulan

Berdasarkan analisa data dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

- Semakin tinggi temperatur reaksi yang digunakan, maka konversi reaksi yang diperoleh semakin besar.
- Konversi reaksi yang meningkat dengan naiknya rasio reaktan (sorbitol : asam oleat)

yang digunakan dan konsentrasi katalis (asam sulfat).

- Konstanta kecepatan reaksi esterifikasi asam oleat dengan sorbitol dengan H_2SO_4 sebagai katalis akan meningkat dengan meningkatnya temperatur operasi, rasio molar sorbitol dengan asam oleat, dan konsentrasi katalis (H_2SO_4) yang digunakan.
- Proses esterifikasi asam oleat dan sorbitol mengikuti reaksi reversibel order satu terhadap masing – masing reaktan.
- Destilasi reaktif dalam esterifikasi ini kurang berjalan dengan baik.

5. Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih sampaikan kepada Kementerian Ristek RI, yang telah memberikan dana RUT X, untuk terlaksananya penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

- Aafaqi, R, mohammed, A.R, Bhatia, s., (1991), Kinetics of Esterification of Palmitat Acid with Isobutyl Alcohol, *International Journal of Chemical Kinetics*, Nagoya Unniversity, Nagoya.
- Bart, H.J., Reidetschlager, J. Schatka, K., and Lehmann, A., (1994), Kinetics of Esterification of Levulinat Acid with n – Butanol by homogeneous Catalysis, *University of Technology Graz*, Graz.
- Lik Anah dan Mahfud, (2003), “ Kinetika Reaksi Esterifikasi Asam Monooleat dan Sorbitol dengan katalis Asam P – Toluen Sulfonat, *Prosiding Seminar Teknik Kimia Indonesia*, , Yogyakarta.
- Marron,S.H,and Lando,J.B,” *Fundamentals of Phycical Chemistry*”, Macmillan Publishing Co.inc, New York,1974.
- Porter, M. R. , (1994), “*Handbook of Surfactant* “, Second edition, Blackie Academic and Professional, London.
- Vieville, C., Mouloungui, Z., and Gaset, A., (1993), Esterification of Oleic Acid by Methanol Catalyzed by p – Toluenesulfonic Acid and Cation Exchange Resins K2411 and K1481 in Supercritical Carbon dioxide, *Industrial Engineering and Chemistry Research*, 32, 2065 – 2068.

Perbandingan Tahap Penumpukan Logam-Logam Berat dalam Ikan Tilapia dari Tasik-Tasik Yang Tercemar dan Tidak Tercemar

Maimon Abdullah, Shahani Shahar, Chung Pei Yin, Norela Sulaiman
Aminah Abdullah dan Salmijah Surif

Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor,
MALAYSIA
E-mail: maimon@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Penumpukan logam-logam berat dalam ikan telah dikaji di ekosistem yang tidak tercemar, iaitu sebuah tasik tadahan air, Tasik Pangson, Selangor berbanding di ekosistem yang tercemar, iaitu tasik bekas lombong bijih timah di Bidor, Perak. Spesies ikan yang paling dominan di kedua kawasan kajian ialah Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) dan penumpukan logam berat dalam ikan kajian telah ditentukan melalui kaedah penghadaman basah dengan HNO_3 dan HClO_4 (10:2), diikuti kaedah Spektrofotometri Serapan Atom (AAS) oleh Perkin Elmer. Hasil kajian menunjukkan bahawa tisu otot, insang dan usus ikan dari tasik bekas lombong di Bidor, Perak telah dicemari oleh logam berat. Nilai kadmium (Cd) dalam tisu otot (3.13 ± 0.03 mg/kg), insang (4.10 ± 0.21 mg/kg), dan usus (5.32 ± 0.145 mg/kg) dan juga plumbum (Pb) dalam otot (27.79 ± 0.53 mg/kg), insang (41.20 ± 0.82 mg/kg) dan usus (50.91 ± 0.51 mg/kg) masing-masing adalah melebihi piawaian keselamatan yang ditetapkan menurut Akta Makanan Malaysia 1983 dan Peraturan-peraturan Makanan 1985. Walau bagaimanapun, arsenik (As), nikel (Ni) dan zink (Zn) berada di bawah piawaian yang ditetapkan. Sebaliknya aras logam-logam berat dalam air dan juga ikan Tilapia dari Tasik Pangson yang habitatnya tidak tercemar di dapati berada pada tahap lebih rendah daripada had piawai keselamatan yang ditetapkan. Antara ketiga-tiga tisu yang dikaji, otot menunjukkan pengumpulan logam berat pada kadar yang paling rendah diikuti insang dan usus. Dalam persekitaran akuatik, rantai makanan merupakan laluan pengumpulan logam berat yang penting terutamanya kepada hidupan akuatik pada aras trofik yang lebih tinggi kerana kesan pencemaran bersifat kumulatif. Ikan merupakan sumber protein utama di kalangan pengguna setempat, maka pengurusan dan pembangunan kawasan tasik untuk aktiviti akuakultur memerlukan pengawalan yang rapi untuk menjamin keselamatan sumber makanan bagi masyarakat setempat.

1. Pengenalan

Jasad air tawar seperti tasik semulajadi maupun tasik buatan manusia seperti empangan dan bekas lombong dapat berfungsi sebagai sinki bagi bahan pencemar yang terdapat dalam air larian permukaan dari kawasan sekitarnya. Tahap pembangunan kawasan perbandaran yang begitu pesat di Malaysia sejak kebelakangan ini telah memberi tekanan

terhadap gunatanah semasa sehingga kawasan yang dahulunya dianggap tanah terbiar dan terpinggir, seperti bekas lombong dan tanah amang kini diusahakan sebagai tapak pertanian, penternakan dan akuakultur (Ramli & Ang, 1999).

Kajian ini membandingkan aras logam berat yang berpotensi toksik (PTEs) dalam ikan, air tasik dan sedimen dasar dari kawasan tercemar

(bekas lombong bijih timah di Bidor, Perak) dan kawasan yang tidak tercemar (tasik empangan Pangson, Selangor). Pemantauan PTEs di kawasan tercemar memerlukan kaedah pengesanan yang cepat, reliabel, dan jimat kos bagi menilai kesan akut dan kronis beban pencemar dan bahan toksik dalam jasad air sebagai langkah berwaspada dalam pengurusan sumber yang melibatkan kesihatan dan kepentingan awam. Hasil kajian membawa impak kesihatan kerana ikan Tilapia (*Oreochromis* spp.) banyak dipelihara dalam tasik-tasik lombong oleh para petani, dan hasil ikan dijual di pasaran tempatan (Abdullah et al, 2000; Ang et al, 2000).

Objektif kedua kajian ini adalah untuk menyaring calon biopenunjuk yang sesuai digunakan bagi memantau penumpukan logam berat, terutamanya elemen berpotensi toksik seperti As, Hg, Cd dan Pb. Kajian oleh penyelidik lain telah mengenalpasti ikan sebagai salah satu agen biopengumpul PTEs yang signifikan selain tumbuhan makrofit dan haiwan bentos seperti gastropoda (Price, 1979; Salmijah et al, 2000). Air dari tasik bekas lombong Bidor dilaporkan mengandungi surihan atau sejumlah kecil PTEs (Ang et al, 2000), walau bagaimanapun, sedimen mengandungi kepekatan PTEs yang lebih tinggi berbanding air. Organisma (biota) ekosistem akuatik pula mampu mengumpul dan memekatkan bahan-bahan pencemar tertentu seperti logam berat dan racun perosak persisten seperti organoklorin, yang seterusnya tertumpuk menerusi siratan makanan, sehingga mencapai toksisiti signifikan dalam organisma yang berada di aras trofik yang tertinggi seperti pada manusia.

Bahan pencemar yang memasuki persekitaran akuatik boleh menyebabkan toksisiti akut yang berakhir dengan kematian dalam organisma terimpak, atau sebaliknya kesan morbiditi kronis yang secara gradual menjejaskan pertumbuhan, pembiakan dan fisiologi umum spesies sensitif. Oleh itu, maka penilaian biologi aras pencemaran dapat digunakan untuk mengenalpasti perubahan komponen habitat seperti kualiti air dan ciri-ciri sedimen dasar yang mempengaruhi respons biota dan komuniti hidupan dalam sesuatu ekosistem itu.

Data biologi, toksikologi dan kualiti air dapat mengukur secara terus impak salah satu atau

beberapa sumber tekanan terhadap biota akuatik (Barbour et al, 1997). Data tersebut juga amat bererti dalam biokriteria untuk menilai kesan pencemaran dan keberkesanan langkah kawalan dan penebatan bagi menangani isu-isu kualiti air (Barbour et al, 1997). Lazimnya biokriteria dan biopenunjuk setempat lebih sesuai dan relevan dengan persekitaran sedia ada, di mana struktur dan fungsi komuniti biotik amat dipengaruhi oleh ciri-ciri spesifik seperti kejernihan dan kualiti air, arus aliran, jenis substrat, vegetasi dan sebagainya yang membentuk habitat tersebut (Inger & Chin, 1962, Lowe-McConnell, 1975). Di Malaysia, biopenunjuk yang sesuai dapat dikenalpasti di kalangan komponen utama ekosistem air tawar, iaitu makrofit, ikan, amfibia, plankton dan makroinvertebrat bentos (Abas et al, 2000). Meskipun terdapat pelbagai kajian berkaitan yang telah dilaporkan (Badri, 1990; JAS, 1999), akan tetapi usaha bersepadu dalam langkah penilaian PTEs dan penabiran di peringkat nasional dan wilayah masih belum dilaksanakan.

3. Bahan dan Kaedah

Persampelan ikan dilakukan di tapak kajian tiga buah tasik bekas lombong (yang meliputi keluasan sekitar 30 ekar) di Bidor, Perak dan Empangan Pangson, Selangor. Sampel ikan untuk penentuan logam berat diperolehi dengan menggunakan jala dan perangkap ikan. Sampel air dan sedimen juga diambil dari tapak kajian. Semua sampel (ikan, air dan sedimen) segera dibawa balik ke makmal dalam bekas sejuk untuk persediaan analisis selanjutnya. Ikan dibilas tiga kali dalam air suling, kemudian ditinggalkan kepada bahagian insang, usus dan otot. Setiap bahagian tisu segar ditimbang, lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C sehingga mencapai berat tetap, dan seterusnya dikisar halus untuk memudahkan penghadaman tisu. Sampel sedimen dan tisu ikan dihadam dengan asid nitrik dan asid perklorik mengikut kaedah piawai AOAC (1984), manakala sampel air dituras sebelum dibuat penentuan logam mengikut kaedah piawai AOAC (1984).

Logam berat yang dikaji adalah Pb, Zn, Cu, Cd, As, Fe, Mn, Al dan Ni, tetapi empat logam terakhir itu dianalisis hanya bagi sampel ikan dari Bidor kerana ia mewakili tapak tercemar. Jumlah logam ditentukan dengan spektrofotometer serapan atom (Perkin Elmer

model 4100). Semua sampel dianalisis sekurang-kurangnya dalam tiga replikasi.

4. Hasil dan Perbincangan

Hasil kajian yang ditunjukkan pada Jadual 1 hingga 7 dan Rajah 1 dan 2, mendapati bahawa otot, insang dan usus ikan Tilapia dari tasik bekas lombong Bidor dicemari logam berat tertentu pada aras yang tinggi (Jadual 1). Kepekatan Cd adalah paling tinggi dalam usus

(5.32 ± 0.14 mg/kg), diikuti dengan insang (4.10 ± 0.21 mg/kg) dan otot (3.13 ± 0.03 mg/kg), dan aras tersebut melebihi piawaian 1.0 mg/kg bagi Cd yang ditetapkan dalam Akta Makanan 1983 dan Peraturan Makanan Malaysia, 1985. Begitu juga aras Pb adalah tertinggi dalam usus, diikuti dengan insang dan otot (50.91 ± 0.51 , 41.20 ± 0.82 dan 27.79 ± 0.53 mg/kg berat kering masing-masing). Julat pengumpulan Pb dalam ikan dari Bidor (Rajah

JADUAL 1. Julat aras PTEs dalam ikan Tilapia dari tasik bekas lombong Bidor

Tisu sampel ikan	Sampel komposit (n)	Plumbum (Pb)	Arsenik (As)	Kadmium (Cd)
Julat PTEs dlm Tilapia (mg/kg)	4	27.26 - 28.32*	0.14 - 0.23	3.10 - 3.16*
Had dibenarkan #		2.0	1.0	1.0

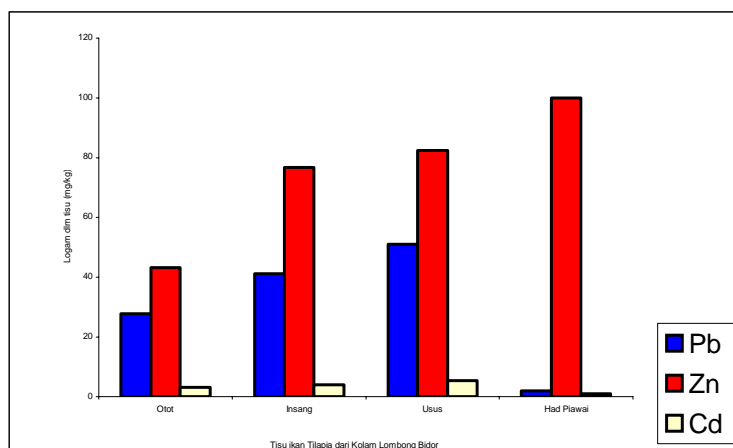
**Nilai PTEs dalam ikan yang melebihi had yang dibenarkan oleh Akta Makanan 1983 dan Peraturan Makanan Malaysia 1985

Had dibenarkan di bawah Akta bagi apa-apa jenis makanan

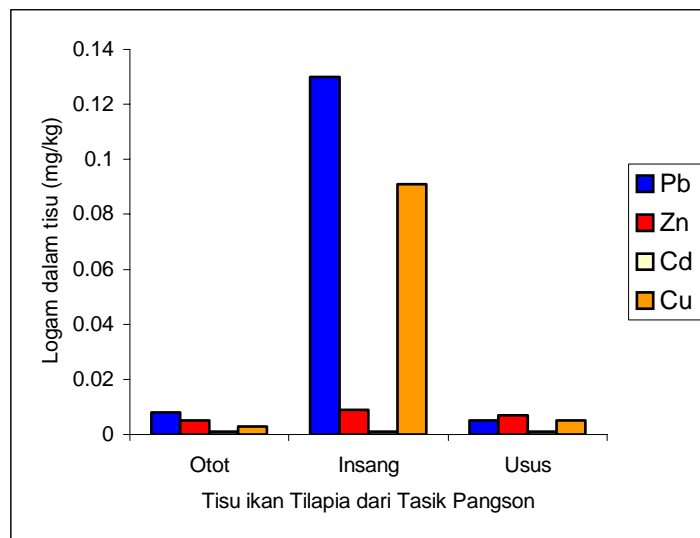
JADUAL 2. Kepekatan logam berat dalam Tilapia ($\mu\text{g/g}$) dari Tasik Pangson

Stesen Persampelan	Pb	Zn	Cu	Cd	As
Insang <i>O. niloticus</i>	0.006 ± 0.004	0.009 ± 0.0001	0.030 ± 0.000	0.001 ± 0.0002	tdk
Insang <i>O. mossambicus</i>	0.013 ± 0.002	0.009 ± 0.0001	0.091 ± 0.001	0.001 ± 0.0001	tdk
Perut <i>O. niloticus</i>	0.005 ± 0.002	0.007 ± 0.0001	0.005 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001	tdk
Otot <i>O. niloticus</i>	0.133 ± 0.001	0.004 ± 0.0001	0.009 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001	tdk
Otot <i>O. mossambicus</i>	0.008 ± 0.002	0.005 ± 0.0001	0.003 ± 0.0001	0.001 ± 0.0003	tdk
Air tasik mg/L	0.007 ± 0.002	0.021 ± 0.019	0.003 ± 0.002	0.007 ± 0.002	tdk
Had dlm mkn mg/kg*	2.0	100	30	1.0	
Had dlm air mg/L**	2.0	100	30	1.0	

(*) Had maksimum dibenarkan dalam bahan makanan dan (**) dalam air oleh Akta Makanan 1983 dan Peraturan Makanan Malaysia 1985



Rajah 1. Aras PTEs dalam Tilapia dari tasik bekas lombong di Bidor, Perak



Rajah 2. Aras PTEs dalam Tilapia dari Tasik Empangan Pangson, Selangor

JADUAL 3. Kepekatan Pb, Cd dan As dalam tanah lombong bijih dan air tasik bekas lombong di Bidor, Perak

PTEs	Had dlm tanah mineral (mg kg ⁻¹)*	Pasir (mg kg ⁻¹)	Pasir pertanian (mg kg ⁻¹)	Selut (mg kg ⁻¹)	Selut pertanian (mg kg ⁻¹)	Air (mg l ⁻¹)
Pb	300	3.91-21.82 (n=14)	3.57-18.21 (n=22)	13.97-18.27 (n=4)	8.92-22.41 (n=4)	<0.01-1.55 (n=8)
Cd	3	0.02-2.33 (n=23)	<0.01-2.62 (n=22)	0.10-1.33 (n=23)	0.10-0.97 (n=4)	<0.01-0.02 (n=8)
As	50	0.02-4.48 (n=18)	0.39-3.12 (n=26)	0.03-3.18 (n=8)	0.68-2.98 (n=4)	<0.001-0.132 (n=8)

*Sumber diadaptasi dari Smith (1996).** Had dibenarkan PTE dalam tanah mineral

1 dan Jadual 1) adalah jauh melebihi had maksimum piawai, iaitu 2.0 mg/kg, dan amat tinggi berbanding logam-logam berat lain (iaitu As, Cd, Ni dan Zn). Walau bagaimanapun, aras As, Ni dan Zn adalah di bawah had yang dibenarkan (Jadual 2)(Abdullah et al, 2000; Ang et al, 2000). Aras PTEs yang tinggi dalam sumber makanan membawa risiko menjejaskan kesihatan pengguna setempat dalam jangka masa yang panjang sekiranya sumber protein harian diperolehi daripada ikan Tilapia pada kadar yang berlebihan.

Sebaliknya analisis sampel ikan Tilapia dari Tasik Empangan Pangson di Selangor menunjukkan bahawa aras logam dalam insang, usus dan otot adalah di bawah had maksimum piawai bagi bahan makanan (Rajah 2 dan

Jadual 2). Tertib menurun bagi aras PTEs dalam insang ikan adalah:

Pb >Cu >Zn >Cd (0.13±0.002, 0.009±0.0001, 0.001±0.0001 dan 0.091±0.001 mg/kg masing-masing, Rajah 2).

Bagi perut Tilapia pula, tertib menurun PTEs adalah:

Zn >Cu = Pb >Cd (0.007±0.0001, 0.005±0.0001, 0.005±0.002, 0.001±0.0001 mg/kg masing-masing, Rajah 2).

Tertib menurun PTEs bagi otot Tilapia pula adalah;

Pb > Zn > Cu >Cd (0.008±0.002, 0.005±0.0001, 0.003±0.0001, 0.001±0.0003 mg/kg masing-masing, Rajah 2).

JADUAL 4. Nilai pH dan aras logam berat dalam air dan sedimen di tasik bekas lombong Bidor, Perak.

Parameter	Bil. sampel terkumpul.(n)	Tapak 1	Tapak 2	Tapak 3
1. Air (mg/L).				
pH	2	5.0(4.9-5.1)	4.2(4.2)	4.3(4.2-4.4)
Pb	2	tdk*	tdk	tdk
Mn	2	0.02(0.02)	0.01(0.01)	0.05(0.05)
Cu	2	tdk	tdk	tdk
Cd	2	tdk	tdk	tdk
Zn	2	0.12(0.12)	0.095(0.10-0.09)	0.05(0.05)
2. Sedimen. (mg/kg).				
pH	2	4.96(4.86-5.06)	5.12(5.12)	6.30(6.26-6.33)
Pb	2	43.65(42.09-45.24)	50.11(49.04-51.17)	37.66(37.30-38.01)
Mn	2	60.58(60.51-60.65)	25.60(25.26-25.93)	44.44(43.42-45.46)
Cu	2	7.93(7.79-8.07)	12.82(12.47-13.16)	14.41(14.04-14.78)
Cd	2	0.45(0.43-0.47)	0.86(0.83-0.88)	0.605(0.60-0.61)
Zn	2	82.76(82.19-83.32)	84.03(82.32-85.73)	40.65(39.76-41.53)

* tdk = tidak dapat dikesan

Logam berat mungkin terkumpul dalam ikan melalui pengambilan air dan makanan bercampur sedimen, terutamanya bagi spesies yang hidup di dasar tasik seperti Tilapia (Mohsin & Ambak, 1991). Air larian mengandungi beban kelodak yang memasuki tasik dan menjadi sebahagian daripada sedimen dasar yang bertindak sebagai sinki beban pencemar dan medium bagi logam berat memasuki ikan menerusi insang dan ususnya. Ketersediaan sampel untuk kajian biopengumpulan amat penting memandangkan kajian terdahulu (Price, 1979; Badri, 1990; Salmijah et al, 2000) mendapati bahawa ikan merupakan biopenunjuk yang baik bagi PTEs. Kajian lanjut yang lebih terperinci berhubung sifat pengumpulan logam oleh ikan dan hidupan lain wajar dilakukan, malahan U.S. Environmental Protection Agency juga telah menyarankan supaya data biologi digunakan bagi menyokong penguatkuasaan undang-undang dan dalam strategi pengurusan air (Barbour et al, 1997) Data sedemikian dianggap berguna dalam menyelia sumber pencemaran yang pelbagai dan terserak seperti efluen pertanian dan air larian permukaan.

Air tasik bekas lombong Bidor mempunyai kepekatan Pb dan Cd yang kurang daripada julat 0.01-1.55 mg/L bagi Pb dan 0.01-0.02 mg/L bagi Cd. Kedua-dua nilai ini adalah lebih tinggi daripada aras Pb dan Cd dalam air Tasik

Pangson (Jadual 3, 4 & 5). Ini menunjukkan air di Tasik Pangson adalah bebas daripada pencemaran Pb dan Cd. Secara amnya aras logam Pb, Cd, Zn dan Cu dalam air Tasik Pangson masih berada dalam julat minimum. Menurut Sarmani (1989) julat kepekatan Pb, Cd, Zn dan Cu yang diperolehi daripada kajian merupakan nilai semulajadi.

Kebanyakan elemen berpotensi toksik dalam air permukaan dan tanah lombong bijih adalah berasal daripada batuan formasi geologi dan endapannya, kecuali bagi Cd (Ramli & Ang 1999). Contohnya Pb berasal daripada galena (PbS) dan cerussite (PbCO₃) manakala As mungkin berpunca daripada arsenopirit (FeAsS) dan Cobaltite (CoAsS). Menurut Ang et al (2000) PTEs juga mungkin merupakan hasil sampingan aktiviti perlombongan dan peleburan bijih. Selain itu, amalan pertanian juga boleh menjadi sumber input PTEs, contohnya tandan buah kosong dan baja tahi ayam yang digunakan petani ada mengandungi PTEs (Ang et al, 2000).

Dalam persekitaran akuatik, komuniti ikan dipengaruhi oleh jenis habitat yang dibezakan mengikut ciri-ciri tertentu seperti kualiti air, substrat dasar, kedalaman dan aliran air (Mohsin, & Ambak, 1991). Pertalian spesies-habitat adalah aspek fundamental bagi ekologi komuniti termasuk bagi populasi ikan (Inger & Chin 1962). Bagi jenis habitat tertentu,

pengkhususan sumber makanan akan berlaku demi mengelakkan daripada perebutan nic di kalangan ahli komuniti, dan PTEs dapat dipekatkan di sepanjang rantai makanan dalam suatu ekosistem yang tidak terlalu kompleks seperti sebuah sungai, kolam atau tasik yang kecil.

Kajian biopengumpulan logam berat yang dijalankan oleh Salmijah et al (2000) di tasik Putrajaya dan beberapa kawasan lain di Malaysia mendapati bahawa logam berat dalam air di kebanyakan stesen persampelan adalah di

bawah had yang dibenarkan oleh Interim Piawaian Kualiti Air Kebangsaan, Malaysia. Makrofit yang tumbuh di dasar kolam dan tasik seperti *Cyperus digitatus* juga didapati mampu mengumpul Fe dan Mn dalam jumlah yang banyak, manakala makrobentos seperti siput akuatik juga adalah merupakan pengumpul logam yang cekap bagi Cu dan Zn.

Dalam kajian penumpukan PTEs dalam tisu beberapa spesies ikan liar dari tasik semulajadi iaitu Tasik Chini, Pahang yang relatif tidak tercemar, Abas, et. al (2001) mendapati bahawa

JADUAL 5. Kepekatan logam berat dalam air (mg/L) di Tasik Pangson Selangor

Stesen ** persampelan	Pb	Zn	Cu	Cd	As
1	0.006±0.004	0.053±0.040	0.002±0.001	0.004±0.003	# tdk
2	0.003±0.003	0.011±0.009	0.003±0.003	0.001±0.000	tdk
3	0.008±0.003	0.011±0.004	0.002±0.001	0.014±0.005	tdk
4	0.008±0.001	0.035±0.022	0.007±0.001	0.002±0.001	tdk
5	0.010±0.010	0.006±0.001	0.001±0.000	0.013±0.002	tdk
6	0.005±0.003	0.008±0.021	0.001±0.001	0.002±0.001	tdk
Purata	0.007±0.002	0.021±0.019	0.007±0.005	0.003±0.001	tdk
*Had dibenarkan	0.05	5.0	0.005	1.0	

* Had maksimum dibenarkan oleh Akta Makanan 1983 dan Peraturan Makanan Malaysia 1985

tdk = tidak dapat dikesan

** Sampel sedimen tidak diperolehi kerana dasar Tasik Pangson terlalu dalam

JADUAL 6. Kualiti fiziko-kimia air di Tasik Pangson Selangor

Parameter air	Persampelan (min ±s.d.)		Purata (min ±s.d.)
	1	2	
Suhu (°C)	30.91±3.83	28.63±0.23	29.77±1.61
DO (mg/L)	5.35±0.32	7.45±0.49	6.40±1.48
pH	6.53±0.15	7.48±0.13	7.01±0.67
Konduktiviti (µS/cm)	36.83±3.89	34.45±0.08	35.64±1.68
Turbiditi (FAU)	10.17±0.75	8.67±1.86	9.42±0.16
Kejernihan (m)	2.22±0.16	2.44±0.19	2.30±0.16
Kejernihan (m)	11.17±8.98	9.47±5.29	10.30±1.20
Nitrat (mg/L)	1.57±0.10	0.77±0.41	1.17±0.57
Fosfat (mg/L)	0.14±0.20	0.30±0.45	0.22±0.11

Jadual 7. Perbandingan aras Cd dan Zn dalam tisu ikan Tilapia (mg/kg) dari pelbagai kawasan

Spesies	Otot	Insang	Kepala	Usus
<i>Tilapia rendalli</i> (Berg et al, 1995)*	Cd: 1.4 – 2.6 Zn: 20.9 – 26.9	- -	- -	-
<i>O. mortimeri</i> (Berg et al, 1995)	Cd: 1.2 – 1.3 Zn: 18.4 – 22.4	- -	- -	-
<i>O. mossambicus</i> (Badri 1988)	Cd: 1.08 Zn: 27.5	- -	Cd: 1.14 Zn: 43.77	Cd: 1.96 Zn: 56.26
<i>O. mossambicus</i> (Tasik Bidor)	Cd: 3.13 Zn: 43.26	Cd: 4.10 Zn: 43.26	- -	Cd: 5.32 Zn: 82.49

Catatan: *ikan disampel dari Tasik Lombong Kariba, Zimbabwe.

kepekatan logam-logam paling tinggi dalam sedimen, dan diikuti dalam tisu ikan. Walau bagaimanapun, aras Pb, Zn, Cu, Cd, Ni dan Cr paling sedikit dalam air berbanding dalam tisu ikan dan sedimen, manakala kandungan PTEs dalam sampel air juga berada di bawah had yang ditetapkan oleh Piawaian Air Minuman Malaysia. Aras PTEs dalam tisu ikan dari kawasan tidak tercemar juga adalah jauh lebih rendah daripada had maksimum yang dibenarkan dalam bahan makanan di Malaysia (Legal Research Board, 1997).

Abas et al (2000) melaporkan bahawa kebanyakan PTEs yang dikaji berkorelasi positif dengan pH dan kandungan bahan organik dan saiz partikel sedimen. Pengukuran beberapa parameter abiotik dari Tasik Pangson, iaitu suhu air, oksigen terlarut, pH, konduktiviti, turbiditi, nitrat dan fosfat (Jadual 6) mendapati bahawa nilai kualiti air yang dikaji berada dalam kelas I-III bagi logam Pb dan kelas I-IV bagi logam Cu mengikut Pengkelasan Interim Sungai-Sungai di Malaysia (Jabatan Alam Sekitar, 2000). Denny, et al (1995) menyatakan secara umumnya aras Cu dalam air tawar ialah 1.0 ug/L. Kepekatan logam Pb, Zn, Cd dan Cu dalam air dan ikan di Tasik Empangan Pangson adalah lebih rendah daripada had piawai yang ditetapkan (Rajah 2 & Jadual 2), oleh itu ikan tersebut adalah selamat dimakan dan tahap pencemaran logam adalah di bawah julat normal bagi kebanyakan kawasan (Jadual 7). Ikan Tilapia juga menunjukkan potensi baik sebagai organisma biopengumpul logam di persekitaran akuatik (Badri, 1990; Berg et al, 1995; Salmijah et al, 2000).

Jasad air yang digunakan bagi keperluan bekalan air dan kegunaan pertanian perlu diawasi untuk mengesan kehadiran beban pencemar dan bahan toksik dalam jumlah yang dikhuatiri boleh menjejaskan kesihatan manusia dan kehidupan lain (Price, 1979). Kajian ini merupakan sebahagian usaha untuk mengumpul data yang diperlukan dalam rancangan pengurusan bersepadu terhadap kualiti air tempatan dan di peringkat wilayah (Barbour et al, 1997). Pengurusan sumber air boleh menggunakan hasil kajian pelbagai pihak dalam merangka dasar pentadbiran dan menilai risiko kepada sumber biologi dan kesihatan manusia, misalnya dalam menimbangkan

faedah dan risiko utilisasi kawasan terpinggir dan terbiar seperti tanah amang dan tasik bekas lombong untuk aktiviti akuakultur, penternakan dan pertanian.

Logam toksik yang tertumpuk dalam ikan adalah terutamanya diambil melalui ingesi dan penurasan. Air tasik lombong mungkin mengandungi hanya sejumlah kecil atau surihan PTEs akan tetapi, dalam sedimen terdapat aras PTEs yang lebih tinggi. Logam As, Pb dan Cd terdapat dalam selut dan air tasik bekas lombong di Bidor (Jadual 3), walau bagaimanapun, tiada satu pun elemen tersebut yang melebihi had piawai bagi kualiti air yang dibenarkan bagi kegunaan pertanian (Smith 1996). Tumbuhan akuatik dan ikan kecil yang menjadi makanan ikan besar juga mungkin tercemar oleh PTEs. Kajian ini mendapati kandungan usus ikan Tilapia mengandungi amaun PTEs yang tinggi yang menunjukkan bahawa proses penurasan dan ingesi adalah merupakan laluan utama pengambilan PTE ke dalam tubuh ikan.

Jika terdapat risiko pencemaran PTEs dalam ikan dari kawasan pertanian, maka pihak pengurusan wajar mengambil pendekatan selamat dan berwaspada, seperti menggunakan sistem penternakan sangkar terapung, yang menggunakan air bahagian atas yang relatif tidak tercemar, manakala pemberian makanan komersial boleh mengurangkan risiko ikan memperoleh makanan di sedimen dasar yang diketahui mengandungi aras PTEs yang tinggi. Spesies ikan yang dternak juga penting, manakala kadar pengambilan dan penumpukan logam berat dalam ikan dan sumber akuatik lain perlu juga dipantau bagi menjamin kesihatan awam.

5. Penghargaan

Kajian ini sebahagiannya disokong oleh geran penyelidikan IRPA no. 01-04-01-0058 dan geran Fundamental UKM no. PPS7/2000. Kami ingin merakamkan penghargaan kepada Alycia Lee dari Chemlab, Khairi, Maslina and Mazlin dari FST, UKM atas bantuan teknikal dan persampelan mengikut arahan kami

6. Rujukan

Abas, A., M. Abdullah, I. Mushrifah, I & C.C. Lau (2001). Heavy metals concentration in water, fish and sediment in Lake Chini, Pahang. .Proceeding of SKAM 14.

**Maimon Abdullah, Shahani Shahar, Chung Pei Yin, Norela Sulaiman
Aminah Abdullah dan Salmijah Surif**

- Abdullah, M., Chung, P. Y., Zuriati, Z. & Ang, L.H. 2000. Heavy metals accumulation in *Oreochromis mossambicus* from ex-mining ponds in Bidor, Perak. Konvensyen Sains dan Teknologi, Ipoh 2000. MOSTE/CSTM/Kerajaan Negeri Perak, 16-18 Oktober 2000
- Ang, L.H., W.M. Ho, Ramli, Mohd. Othman, Maimon Abdullah, P.Y. Chung & L.T. Ng. 2000. The concentration of Pb, As, Cd and Hg in some food crops and fish produced from ex-mining sites in Bidor, Perak. Conference on Science & Technology. COSTAM 2000. Kota Kinabalu. COSTAM/MOSTE/CSTM.18-20 September 2000.
- AOAC methods. 1984. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Washington, D.C. 385-413.
- Badri, M.A. 1990. Heavy metals pollution in the aquatic environment: The analyses of aquatic organisms. In: Sham Sani, Mazlan Othman dan Badri, M.A. (eds.). *Monitoring Strategies in Environmental Management and Assessment. National Workshop 28 Nov – 1 Dec 1988*. Bangi: Penerbit Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Barbour, M.T., Gerritsen, J., Snyder, B.D. & Stribling, J.B. 1997. Elements of Biomonitoring. In: *Revision to Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Rivers: Periphyton, Benthic, Macroinvertebrates and Fish*. Contract No.841-D-97-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Berg, H., Kibus, M. & Nils Kautsky . 1995. Heavy metals in tropical Lake Kariba, Zimbabwe. *Water, Air and Soil Pollution*. **83**: 237-252.
- Denny, P., Bailey, R., Tukirhawa, E. & Mafabi, P. 1995. Heavy metal contamination of Lake George (Uganda) and its wetlands. *Hydrobiologia*. 297:229-239.
- Dominski P. 1985. Automated Cold Vapour Determination of Mercury; EPA Stannous Chloride Methodology. *Varian AA at work No. AA-51*. Sept. 1985.
- Inger, R.F. & P.K. Chin. 1962. The freshwater fish of North Borneo with Supplementary Chapter by P.K. Chin. *Field. Zool*. 45: 268 pp.
- Jabatan Alam Sekitar (JAS) 2000. Laporan Akhir Program Pengawasan Biologi dan Indikator Biologi bagi Sungai-Sungai Di Malaysia. September 2000.
- Legal Research Board. 1997. *Food Act 1983 and Food Regulations 1985: All amendments up to October, 1996-Act 281*. MDC Publishers Printer Sdn. Bhd., 342 hlm.
- Lowe-McConnell, R.H. 1975. Fish communities in tropical freshwaters. Longman Incorporated, New York. USA.
- Mohsin, A.K.M. & Ambak. M.A.. 1991. *Ikan air tawar di Semenanjung Malaysia*. Penerbit Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Price, D.R.H. 1979. Fish as indicator of water quality: Dlm: James, A.A. & Evison, L (penyt). *Biological indicators of water quality: Methods and applications*. Washington, Hemisphere Publishing Corp. hlm: 8.1-8.17.
- Ramli Mohd Osman & LH Ang. 1999. The occurrence of some important potentially toxic trace elements in ex-mining ponds located in Bidor, Perak. Dlm: P120-127, COSTAM, Proceedings of Malaysian Science dan Technology Congress 1999.8-10 November, 1999. Hilton Kuching, Kuching, Sarawak.
- Salmijah Surif, Maimon Abdullah & Musyriifah Idris. 2000. Studies on pollution and management of heavy metals in Malaysian environment. Seminar Pemantauan Penyelidikan Di UKM. 30 Disember 2000, Melaka.
- Sarmani, S. 1989. Kajian Permonitoran Kualiti Air Lembangan Sungai Langat, Selangor. *Sains Malaysiana* 14(2): 245-255. Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi
- Smith, SRS. 1996. *Agricultural recycling of sewage sludge and the environment*. CAB International, Biddles Ltd., Guildford. 382p
- Zuriati Zakaria & Maimon Abdullah. 2000. Ex-mining Pools - Hazards or Resource? Konvensyen Sains dan Teknologi Ipoh. COSTAM 2000. MOSTE/CSTM/Kerajaan Negeri Perak, 16-18 Oktober 2000.

Extraction and Purification of Arachidic Acid from Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Kernel Fat

Mamot Said, Jalifah Latip & Suhana Samat

School of Chemical Sciences & Food Technology
Faculty of Sciences and Technology
University Kebangsaan Malaysia
43600 UKM-Bangi, Selangor, MALAYSIA

Abstract

*In this study, rambutan (*Nephelium lappaceum*) kernel fat (RKF) was extracted from the seeds using hexane as solvent in a Soxhlet apparatus. The composition of the fatty acids was determined by gas chromatography (GC). The extracted fat was then fractionated in acetone (acetone: fat 10 : 1, 8 hr, 5°C) into RKF stearin and RKF olein fractions. The long chain saturated fatty acid from unfractionated RKF and RKF stearin were further concentrated through saponification (30% methanolic KOH), followed by acidification (0.5 N HCl) prior to urea complexation (2.5 M ethanolic urea) at 5°C and holding times (10minute–24hr). The arachidic rich fraction (top phase) was collected and further purified on silica gel column using hexane: ethyl acetate: acetic acid (70:30:1) as eluting solvent prior to structural analysis by NMR. Results from GC analysis showed that the RKF contained 38.41% arachidic acid (20:0). The highest yield of arachidic acid with urea complex were obtained from unfractionated (63.37%) and fractionated (77.31%) RKF after holding at 5 °C for 30 minutes and 60 minutes respectively. NMR, IR and GC spectrum of purified fraction confirmed the identity of the acid as arachidic acid.*

1. Introduction

In developing countries, most of seeds from fruits are not used and discarded as wastes. One of the ways to solve this environmental problem is to find the possible use of these agro-industrial wastes as nonconventional sources of useful materials, such as fats and oils. Vegetable fats and oils are widely used in food, pharmaceutical, cosmetic and chemical industries, and are normally obtained from oilseeds (Fuentes, 2004). Fats and oils from plant sources are cholesterol free and provide important essential fatty acids as well as precursors for a group of hormone-like compounds that regulate a variety of physiological function. Fats and oils also act as carriers of fat-soluble vitamins (Haumann, 1997). Based on the types of fatty acids esterified on the glycerol backbone, they can be classified either as saturated, unsaturated, medium chain (MCT) or long chain (LCT)

triacylglycerols. The fatty acids of MCTs are of 12 and less carbon length, while those of LCTs are of greater than 12 carbon length. MCTs are often used as the basis for structured lipids synthesis. Unlike common fatty acids in fats and oils, MCTs go directly into the portal vein and are rapidly converted into energy (Kennedy, 1991). MCTs are manufactured from fractionated medium chain fatty acids obtained from such oils as coconut and palm kernel. However, because MCTs alone do not contain essential fatty acids, they need to be used together with long chain triacylglycerols to provide a balanced nutrition in enteral and parenteral nutrition product. In this necessity of an MCT/LCT combination that inspired the development of the structured lipids (SLs). Structured lipids are triacylglycerols containing mixtures of short-, medium-, and long chain fatty acids attached to the glycerol backbone for specific functionality. SLs containing

medium chain and longer chain fatty acids were claimed to have special health benefits (Haumann, 1997). Although most SLs are currently used for medical application, some are appearing in food products. Medium chain fatty acids could be easily obtained either from coconut oil (4.6-9.4% and 5.5-7.8%), or in palm kernel oil (2.4-6.2% and 2.6-5.0%) of C8:0 and C10:0 respectively (Padley et al. 1990). While the main sources of long chains fatty acids are the tropical fruits seeds, such as rambutan (*Nephelium lappaceum*) kernel fat that reported to contain 38.41% arachidic acid (Helmi, 2002).

Fatty acids are normally prepared from fats and oil either by fat splitting, saponification followed by acidification or alcoholysis. The liberated fatty acids or esters are further fractionated into saturated and unsaturated fractions through urea complexation. Urea complexation seems to be the most appropriate method for the preparation of long chain fatty acids. It allows the handling of large quantities of material in simple equipment and only required an inexpensive solvent, milder conditions (e.g. 5°C) and lower cost (Guerrero et al. 2001). Urea generally crystallizes in tetragonal form, but in the presence of certain aliphatic compounds it form hexagonal prisms. Some aliphatic compounds will stay inside the hexagonal prism and form complexes with urea. This special property of urea can be used to separate saturated fatty acids or their esters, which are flexible straight chain molecules, from unsaturated fatty acids or esters whose flexibility becomes less with the increase in the number of double bonds (Gunstone, 1983).

In this studies, rambutan kernel fat (RKFT) was first fractionated into stearin and olein fractions prior to saponification. The liberated fatty acids were later fractionated into saturated and unsaturated fractions via urea complexation.

2. Eksperimental

Material

Fresh rambutan fruits were purchased from various locations around Bandar Baru Bangi, Selangor. All seeds were manually separated from the pulp and then dried in laboratory oven at 60°C for 4 days. Urea was purchased from Sigma. All reagents (analytical grade) and solvents (chromatography grade) were purchased from Merck.

Methods

Preparation of RKF: The seeds were ground and the oil/fat was extracted in n-hexane in a Soxhlet apparatus. The oil was recovered by removing the residual n-hexane in a rotary evaporator heated at 60°C under a stream of nitrogen. The collected fat/oil (RKF) was placed in airtight vials and stored at 4°C until analyzed (AOAC, 1990).

Fractionation: Rambutan Kernel Fat (RKF) was fractionated into olein (liquid) and stearin (solid) fractions according to the method of Unsal et al. (2003). Prior to fractionation, RKF was completely melted at 70°C. Then acetone (100cm³) was added into the oil (10g) and mixed well. The solution was transferred into a laboratory designed fractionation vessel cooled at a constant temperature of 5°C for 8 hour. At the end of the cooling period, the solid fraction formed was filtered under vacuum using a precooled Buncher funnel and filter flask and washed twice with acetone (50cm³). The solvent was removed from the liquid (olein) and solid (stearin) fraction under reduced pressure in a rotary evaporator. Fatty acids composition was determined by gas chromatography (GC) according to the method of Timms (1978).

Preparation of fatty acids from Rambutan Kernel fat: Preparation of fatty acids from RKF (rambutan kernel fat) and RKF (stearin) was carried out according to Hayes et.al (1998) with slight modification. About 5.0 g of Rambutan Kernel Fat (RKF) and RKF (stearin) were refluxed in 25ml of 0.5N methanolic KOH in 95% methanol at 65±2°C for 2 hours. The soap formed was collected and extracted with n-Hexane : water (50:50) (2x100ml) and organic layer (top) was collected and solvent was removed by evaporation. The presence of fatty acid was confirmed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel according to the method of Kirchner (1967) using 80:20:0.5 petroleum eter: diethyl eter: acetic acid (v/v/v) as developing solvent.

Urea complexation: Urea complexation of fatty acids was carried out according to the method of Hayes et al. (1998). About 6.0g of urea was dissolve in 40ml of 95% (v/v) ethanol at 65±5°C, followed by the addition of 2g fatty acid from 2.2.3 with stirring to form a clear homogenous solution. Then, the solution was transferred into a jacketed beaker maintained at

5°C and allowed to crystallise for 10 minutes. The crystals formed (urea complex fraction, UCF) was recovered by gravity filtration and the filtrate (non urea complex fraction, NUCF) was collected. The recovered UCF was rinsed with 10 cm³ isooctane. The rinsed UCF was transferred into 500 cm³ separating funnel. The fatty acids were further extracted by adding 5 cm³ n-hexane and 200 cm³ acidified (pH=6.0) distilled water, followed by washing with another 200 cm³ acidified water (Wanasundra 1999). The organic layer (top) containing fatty acids was collected for gas chromatography (GC) analysis. The NUCF and isooctane rinsate were pooled and the fatty acids were extracted in the similar manner prior to GC analysis. The fatty acids composition of the fractions was determined using gas chromatography according to the method Timms (1978). The experiment was repeated for 20, 30, 60 minutes and 24 hours cooling at 5 °C.

Isolation of Arachidic Acid: UCF containing the highest amount of arachidic acid further fractionated by silica gel column (i.d. 1.5cm x 30cm) preconditioned in n-hexane. Before loading, the UCF (1.15g) was dissolved in 5 cm³ n-hexane. The arachidic acid was fractionated by stepwise elution using 200 cm³ n-hexane : diethyl ether mixture of increasing polarity. The polarity of eluting solvent was increased starting from n-hexane : diethyl ether (9:1) to 100 % (v/v) diethyl ether. The fractions were collected in 5 cm³ vials and analysed by TLC using petroleum eter : diethyl ether : acetic acid, 8:2:1 (v/v/v) as developing solvent (Kirchner, 1967). The presence of carboxylic acids was determined by using ethanolic bromocresol green (1%) solution as a spraying agent. Fractions that showed only a single spot on TLC plates were pooled and analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Spectroscopy FT-Infra Red (FTIR) and GC.

Fatty acid analysis: Methylation of fatty acids was done according to the method of Timms (1978). Then 5µl of fatty acid methyl esters (FAME) was injected into Agilent 6890 series Gas Chromatograph equipped with flame ionization detector (FID), column (BPX 710,60m long, 0.32mm i.d, film thickness 0.25µm) with the following conditions: the column oven temperatures was programmed from 120-180°C at 4°C /min and hold to 210°C for 4 minutes and the injector and the detector

temperature were set at 240°C, split ratio 1:60. Separation was carried out with nitrogen as carrier gas at 1.5ml/min. The peaks were identified by comparing the retention time with standard FAME, and plotting the log of retention time against equivalent carbon length (ECL). The percentage of each peak was calculated as the percentage of the total area of all the peaks. The results of the present study are means of duplicate analyses.

Spectroscopic analysis: NMR analysis were performed on JEOL ECP 400 NMR spectrometer at frequency of 400 MHz (¹H). About 10 mg of the samples was dissolve in CDCl₃. Trace amount of CHCl₃ in the solvent used as reference exhibits signal at 7.27 ppm in ¹H. IR (Infra Red) spectra were obtained from KBr plates made using Perkin Elmer-1300 FT-IR spectrometer. The spectra in absorption range of 600cm⁻¹ to 4000cm⁻¹ were recorded.

3. Results And Discussions

Fractionation of RKF :

Fractional crystallisation from organic solvent was one the earliest technique used to separate natural fats into their components. The solvent most extensively used is acetone because triglycerides having different numbers of saturated acyl-group and double bonds exhibit different solubility in this solvent (Vrettakou et al. 1984). Figure 1 shows the fatty acid composition of olein and stearin fractions of RKF. It was clearly shown the main fatty acid in RKF and fractions was arachidic acid (C20:0) with the highest (70.92%) was found in the stearin fraction. Olein fraction was high in oleic (C18:1), arachidic (C20:0) and arachidonic (C20:1) acids. While the main fatty acids in RKF was oleic (C18:1) and arachidic (C20:0) acid. As expected, the RKF stearin was the highest in C20:0, therefore it was later used for further separation and isolation of arachidic acid by urea complexation and column chromatography.

Urea complexation: Urea complexation is a well-established technique for elimination of monosaturated fatty acid (Ratnayake, 1988). The effect of holding time at 5 °C on the content of C20:0 in urea complex fraction (UCF) and non-urea complex fraction (NUCF) obtained from RKF and RKF stearin are shown in Table 1 and 2 respectively. As shown, both UCF and NUCF contained C20:0. As expected the percentage of C20:0 was higher in the UCF.

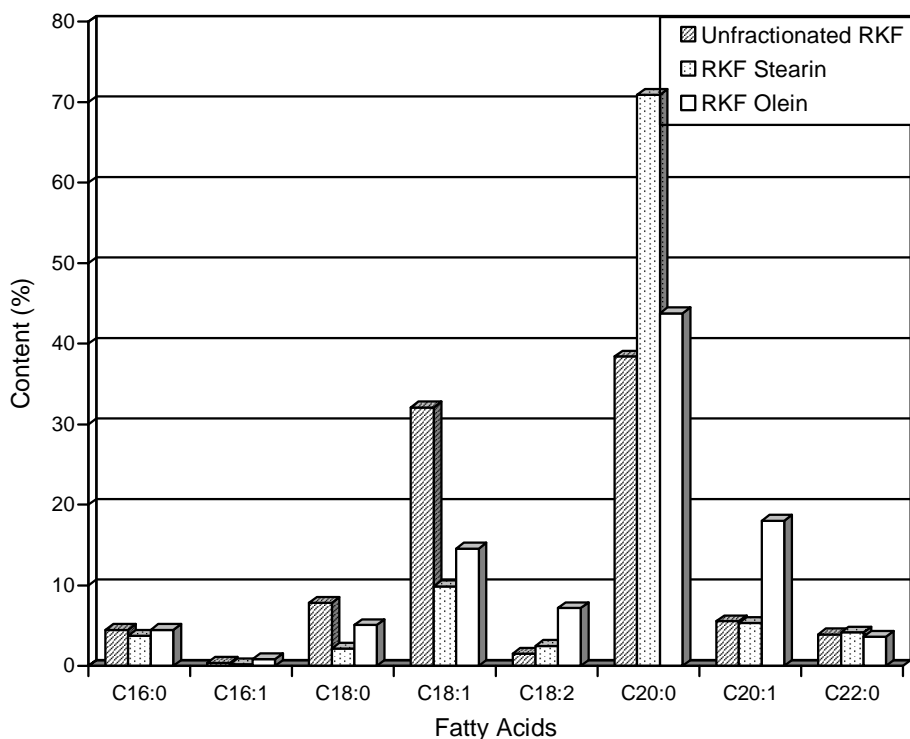


Figure 1: Fatty acids composition of Rambutan Kernel Fat (RKF), RKF stearin and RKF olein.

Table 1. Composition of long chain fatty acids (C18 – C20) in UCF and NUFC of RKF in different holding times at 5 °C (n=2)

Holding Time (minute)	Urea Complex Fraction (UCF)			Non-Urea Complex Fraction (NUFC)		
	C18 :0	C18 :1	C20 :0	C18 :0	C18 :1	C20 :0
10	9.93± 1.09	31.59 ±0.86	38.05 ±1.27	8.46 ±0.79	31.54 ±0.88	35.08 ±0.23
20	12.57 ±0.83	31.29 ±1.21	57.1 ±1.40	8.14 ±1.09	25.23 ±1.57	33.19 ±0.88
30	10.89±0.99	21.62 ±1.40	63.37 ±1.46	10.28±0.63	41.64 ±1.41	34.34 ±1.21
60	11.59 ±0.99	34.29 ±1.56	41.6 ±2.11	4.91 ±0.40	46.02 ±1.21	36.63 ±0.66
120	7.97 ±0.19	40.38 ±0.47	36.4±0.72	8.22 ±0.98	37.34±1.06	35.01±0.79
24 Hour	6.26 ±0.78	31.14±1.42	24.81 ±0.27	3.83±0.51	58.48±0.41	12.17 ±0.37

Table 2. Composition of long chain fatty acids (C18 – C20) in UCF and NUFC of RKF stearin in different holding times at 5 °C (n=2)

Holding Time (minute)	Urea Complex Fraction (UCF)			Non-Urea Complex Fraction (NUFC)		
	C18 :0	C18 :1	C20 :0	C18 :0	C18 :1	C20 :0
10	11.79 ±0.62	21.81 ±1.15	60.65 ±3.20	9.89 ±2.24	38.57 ±3.64	41.96 ±7.17
20	8.75±0.06	33.88 ±0.24	45.45 ±0.32	5.65 ±0.29	38.26 ±1.76	42.31 ±2.17
30	10.09±0.76	26.06 ±0.53	54.60 ±3.07	8.98 ±0.60	37.81 ±2.54	48.67 ±3.27
60	4.16 ±2.06	5.81 ±3.67	77.31 ±0.71	10.31±0.37	27.76 ±5.54	13.64±1.66
120	9.31 ±0.85	19.77 ±1.48	61.09 ±3.71	9.60 ±1.25	33.35 ±5.14	20.79 ±2.58
24 Hour	20.31±0.14	34.31 ±1.27	20.15 ±2.42	3.01 ±0.45	71.44 ±10.6	13.86 ±2.06

As shown in Table 1, the highest concentration (63.37 ±1.46 %) and 77.31±0.71) of C20:0 was obtained from RKF in urea complex fraction (UCF) at 30 minutes holding time. While from UCF of RKF stearin, the highest content of

C20:0 was obtained at 60 minutes holding time (Table 2).

Spectroscopy Analysis: UCF from RKF stearin rich in C20:0 was passed through a silica gel column chromatography and fractions showing

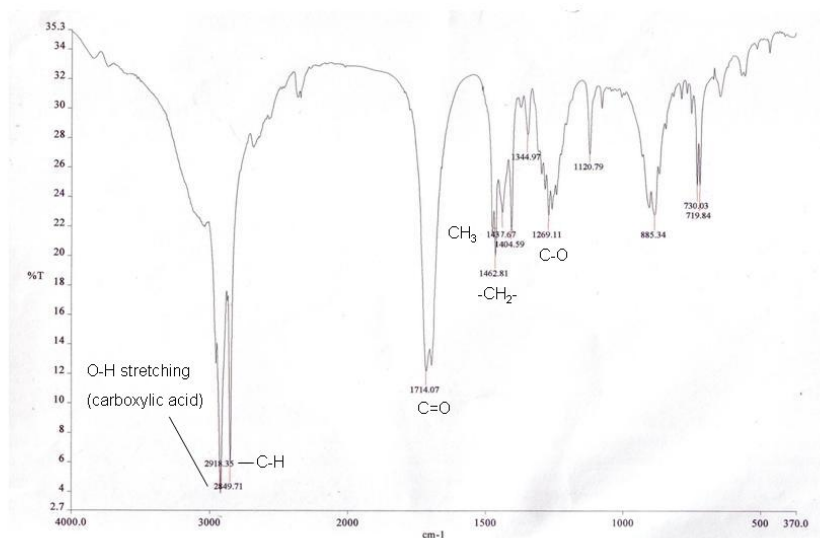


Figure 2. FTIR spectrum of isolated and purified arachidic acid.

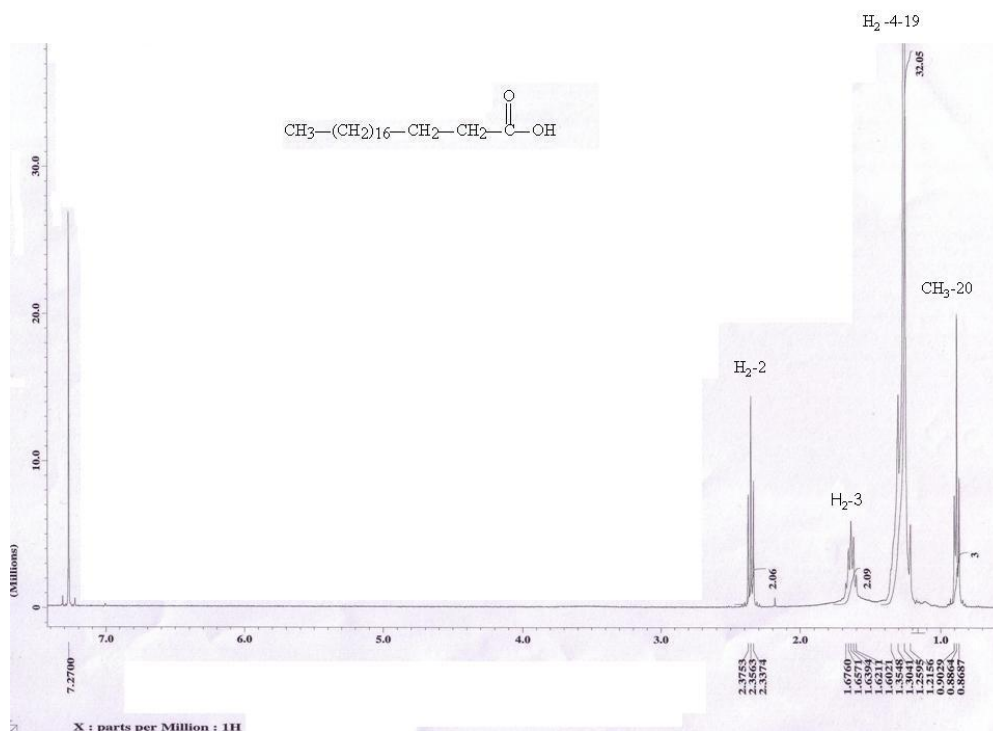


Figure 3. The ^1H NMR spectrum of isolated and purified arachidic acid.

a single spot on TLC plates were pooled and analyzed for the authenticity of C20:0 by GC, FTIR and NMR. The GC chromatogram of the collected fractions compared to a standard

C20:0 confirmed that they contained arachidic acid with a retention time of 29.40 minutes

IR spectrum (Figure 2) showed characteristic absorption band of carboxylic acid as shown by

the carboxyl C=O absorption band at 1714 cm^{-1} and a broad O-H stretching at 2918 cm^{-1} . According to Parikh (1974), the C=O group in dimerized saturated aliphatic acids absorbs in the region of $1720\text{-}1706\text{ cm}^{-1}$ and a broad O-H stretching absorption in the region of $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$. The weaker C-H stretching bands were generally seen superimposed by the broad O-H band. The absorption region at around 2849 cm^{-1} was assigned to C-H stretching. Two bands arising from C-O stretching and O-H bending appeared near 1269 cm^{-1} and 1437 cm^{-1} respectively. Both of these bands involve some interactions between C-O stretching and in plane C-O-H bending.

The ^1H NMR spectrum showed signals typical of fatty acids (Figure 3). One triplet was observed at δ 2.33 ($J= 7.56\text{ Hz}$) revealed the methylene protons ($\text{H}_2\text{-}2$) attached next to carboxyl group and a multiplet at δ 1.60 belongs to the adjacent methylene protons ($\text{H}_2\text{-}3$). Other prominent signals is the upfield triplet ($J= 7.0\text{ Hz}$) at δ 0.86 which was consistent to the terminal methyl of the fatty acid chain. The remaining signal is the intense multiplet at δ 1.21 consisting of 32 methylene protons in accordance to remaining 16 methylenes in the arachidic chain. Each signal was comparable to the signals of the authentic sample.

4. Conclusion

In conclusion, the seeds of rambutan (*Nephelium lappaceum*) fruit is one of the potential sources of long chain fatty acids, especially C20:0. The acid content could be enriched, through fractionation and later isolated and purified through saponification followed by urea complexation.

5. Acknowledgement

This research was sponsored by the Ministry of Science, Technology & Environment Malaysia under to-down IRPA Grant No. : 09-02-04-004-BTK/ER/008.

6. References

Ackman, R.G., Retnayake, W.M.N. & Olsson, B. (1988). The 'basic' fatty acid composition of Atlantic fish oils: potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**. 136-138

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 13th Ed. Washington. D.C.

Fuentes, J.A. & Bazua, D. (2004). Mango seed uses: thermal behaviour of mango seed almond fat and its mixtures with cocoa butter. *Bioresource Technology*. **92**, 71-78.

Guerrero, J.L.G. & Belarbi, E.H. (2001). Purification Process for Cod Liver Oil Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **78**(5). 477-484

Gunstone, F.D. & Norris, F.A. (1983). *Lipids in Food Chemistry, Biochemistry and Technology*. Pergamon Press Inc. New York, page 16.

Haumann, B.F. (1997). Structured Lipids. *INFORM*. **8**(10), 1004-1011

Hayes, D.G., Bengtsson, Y.C., Alstine, J.M.V. & Setterwall, F. (1998). Urea Complexation for the Rapid, Ecologically Responsible Fractionation of Fatty acid from Seed Oil. *J.Am.Oil.Chem.Soc.* **75**(10).

Helmi, W. (2002). *Pengubahsuaian ciri-ciri fizikokimia lemak koko menggunakan interesterifikasi lipase dan penggunaannya dalam penghasilan coklat berinti dan coklat salutan ais krim*. Tesis Ijazah Sarjana Sains. Universiti Kebangsaan Malaysia.

Kennedy, J.P. (1991). Structured Lipids: Fats of the Future. *Food Technology*. **45**(11), 76-83

Kirchner, J.G. (1967). *Technique of Organic Chemistry Thin Layer Chromatography*. Vol. XII. John Wiley & Sons Inc. US. pg 417.

Parikh, V.M. (1974). *Absorption Spectroscopy of Organic Molecules*. Addison Wesley Publishing Company. Reading. 73-75

Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthew, D. & Ackmann, R.G. (1988) Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oil via Urea Complexation. *Fat Sci. Technol.* **10**. 381-386

Silverstein, R.M., Bassler, G.C. & Morrill, T.C. (1963). *Spectrometric Identification of Organic Compound*. 3rd Ed. John Wiley & Son, Inc. New York.

Timms, R.S. (1978). Artefact peaks in the preparation and Gas Liquid Chromatographic determination of methyl esters. *Aust.J. Dairy. Tech.* **33**(1).4-6

Unsal, M. & Aktas, N. (2003). Fractionation and characterization of edible sheep tail fat. *Meat Science*. **63**. 235-239

Vrettakou, S.S., Komaitis, M.E. & Voudouris, E.C. (1984). Triglyceride Composition of Olive Oil, Cottonseed oil and their Mixtures by Low Temperature Crystallization and Gas Liquid Chromatography. *J.Am.Oil.Chem.Soc.* **61**(6).1051-1055

Mamot Said, Jalifah Latip & Suhana Samat

Wanasundra, U.N. & Shahidi, F. (1999). optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*. **65**. 41-49
Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation:

Pengaruh Perlakuan dan Komposisi Terhadap Karakteristik Membran Poliuretan dari Asam Lemak Bebas Terhidrasi dan 2,4 Toluena Diisosiyanat

Marlina¹, N.M. Surdia², C.L. Radiman², S. Achmad²

¹Jurusan Kimia, Universitas Syiah Kuala, Darussalam-Banda Aceh

²Departemen Kimia, Institute Teknologi Bandung, Ganesha 10 Bandung

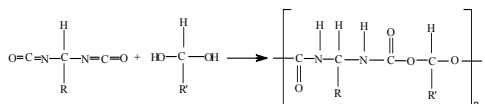
Abstrak

Proses proteksi asetilasi terhadap gugus hidroksi mempengaruhi sifat asam lemak bebas sebagai monomer pada pembuatan membran poliuretan (PU). Komposisi optimum OH : TDI pada sintesa membran PU adalah 1.2 : 0,41 (mol/mol) untuk membran dari asam lemak terhidrasi tanpa proteksi dan 1.2 : 0,52 (mol/mol) untuk yang terproteksi asetilasi. Kinerja optimum pada proses osmosa balik diperoleh dari membran tanpa proteksi pada tekanan 20 atm, dengan nilai fluks sebesar 29,61 L/m² jam dan faktor rejeksi 44,3 %. Membran ini bersifat transparan, elastis dan kuat, dengan karakteristik sebagai berikut: proses polimerisasi berlangsung sempurna, indeks ikatan hidrogen (HBI) 0,43, temperatur transisi gelas 127,02 °C, temperatur dekomposisi 401,55 °C, kristalinitas 60,34 %, tegangan 328,45 Mpa, regangan 2,29 %, serta ketahanan jebol 767 Kpa, mempunyai morfologi yang homogen dan rata sebelum dan sesudah aplikasi pada proses osmosa balik (reverse osmosis).

Kata kunci: minyak jarak, proteksi, asetilasi, hidrasi, osmosa balik, fluks, factor rejeksi, temperatur transisi gelas, dekomposisi, kristalinitas, tegangan, regangan, kekuatan jebol, morfologi.

1. Pendahuluan

PU dapat disintesis dari berbagai bahan baku yang mengandung gugus hidroksil (-OH) baik mono maupun poli^[1,2,3,4,5,6,7,8], diantaranya adalah polietilen glikol (PEG), asam laktat, sejumlah asam nukleat, fenol, karbonimida, dan residu gula. Bahan dasar tersebut direaksikan dengan berbagai jenis isosiyanat, antara lain toluena diisosiyanat (TDI), metilendifenil diisosiyanat (MDI), dan polimer isosiyanat (PMDI). Persamaan reaksi pembuatan PU adalah sebagai berikut:

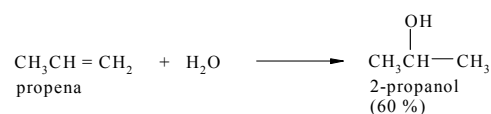


Poliuretan (PU) merupakan polimer yang telah dikenal luas oleh masyarakat, yaitu sebagai busa tempat tidur, sofa, asesoris mobil, serat, elastomer, dan pelapis (*coating*). Produk PU mempunyai bentuk yang beragam yaitu dari plastik elastomer linier lembut sampai busa

termoset yang keras dan kaku^[1,2].

Minyak jarak mengandung trigliserida atau ester gliserol dan asam-asam lemak bebas, di mana komponen utamanya adalah asam risinoleat sebesar 80 – 90%^[10,11]. Asam lemak bebas ini mengandung dua gugus fungsi yaitu gugus hidroksil dan ikatan rangkap yang dapat digunakan sebagai sumber-sumber -OH, dengan demikian asam lemak dari minyak biji jarak ini dapat diolah menjadi PU^[9,10].

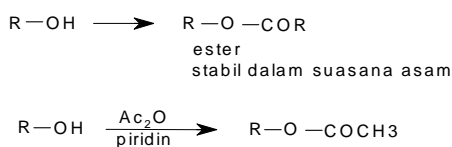
Hidrasi suatu alkena adalah metode yang sangat penting dalam industri untuk memproduksi alkohol. Hidrasi biasanya dilakukan dengan melewatkan alkena dalam campuran asam sulfat 98 % dan air^[11].



Analog dengan reaksi di atas, maka dalam

penelitian ini proses hidrasi dilakukan terhadap ikatan rangkap dari asam lemak.

Untuk menghindari reaksi samping antara gugus -OH dan asam sulfat selama reaksi di atas, dapat dilakukan proteksi dengan cara asetilasi^[11,12], di mana gugus -OH diubah menjadi suatu ester.



Membran PU dibuat dengan cara mereaksikan asam lemak bebas baik dengan maupun tanpa proteksi terlebih dahulu dan variasi dari konsentrasi toluen diisosianat. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan membran dengan pori yang rapat (dense membran) yang dapat diaplikasikan pada proses osmosa balik (reverse osmosis)^[13].

2. Percobaan

Bahan utama : 2,4 toluen diisosianat (TDI), asam lemak bebas, minyak jarak, CHCl_3 , NaOH, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , benzene, Ac_2O , piridin, H_2SO_4 .

Alat utama :

Peralatan yang digunakan untuk karakterisasi adalah alat spektrofotometer infra merah (IR), osmosa balik *Membran Master RUW-4 Nitro Denko*, uji jebol jenis *Mullen*, Scanning Electron Microscop (SEM) jenis Jeol JSM-T220A, alat uji kekuatan tarik jenis Shimadzu Autograph AG-500 B, alat DTA jenis *General V4.1C Du Pont 2000* yang dilengkapi komputer untuk penentuan titik transisi gelas dan titik leleh, difraksi sinar-x merek Diano yang dilengkapi dengan komputer untuk penentuan derajat kristalinitas, dan seperangkat peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Metoda:

Persiapan Asam Lemak Terhidrasi

Pemisahan asam lemak dari ester gliserol, proteksi gugus -OH dan proses hidrasi ikatan rangkap menggunakan air dan H_2SO_4 dilakukan dengan cara standard yang umum^[11,12].

Sintesis Membran PU

Pembuatan larutan *dope* PU dilakukan dengan mereaksikan asam lemak bebas dan TDI dengan komposisi asam lemak bebas: TDI bervariasi dari 1,2 : 0,2 sampai 1,2 : 1,0 (mol/mol), aduk pada temperatur 100°C dengan waktu reaksi selama 5 menit. Larutan *dope* ini dicetak di atas plat kaca,

kemudian dilakukan koagulasi dalam air pada temperatur kamar selama 1 jam^[12].

Karakterisasi

Penentuan karakteristik membran PU dilakukan berdasarkan standard ASTM dan SII^[14].

3. Hasil Dan Pembahasan

Pengaruh Perlakuan

Tabel 1 menunjukkan perbandingan komposisi -OH dari asam lemak bebas terhadap isosianat akibat perbedaan perlakuan awal yaitu proteksi atau tanpa proteksi gugus -OH dari asam lemak bebas. Dari hasil *trial and error* diperoleh komposisi optimum kedua jenis asam lemak tersebut adalah sebagai berikut..

Dari tabel 1 tampak bahwa proses proteksi

Tabel 1 Komposisi Monomer Pada Sintesa Membran PU Asam Lemak

Proses	Komposisi OH:TDI (mol/mol)
Hidrasi	1,2 :0,41
Asetilasi-Hidrasi	1,2 :0,52

terhadap gugus -OH mempengaruhi proses polimerisasi pada sintesa membran PU. Hal ini kemungkinan disebabkan karena proses proteksi menyebabkan gugus -OH dari asam lemak terlindungi selama proses hidrosilasi, sehingga pada akhir proses gugus -OH yang terbentuk lebih banyak, yang mengakibatkan TDI yang dibutuhkan untuk membentuk membran PU juga lebih besar.

Pengaruh Komposisi Diisosianat

Hasil penelitian juga menunjukkan bila konsentrasi TDI lebih besar dari konsentrasi-konsentrasi di atas, maka larutan *dope* yang dihasilkan lebih kental dan membran yang dihasilkan menjadi keras dan kaku, bahkan bila konsentrasi TDI lebih besar dari pada konsentrasi -OH maka akan terbentuk busa kaku. Hasil ini menunjukkan bahwa bagian keras (hard segment) dari poliuretan yang terbentuk lebih banyak dari pada bagian lunak (soft segment). Fenomena ini sesuai dengan yang dihasilkan oleh Marlina dkk (2004) terhadap PU yang berasal dari asam lemak teroksidasi melalui proteksi asetilasi.

Karakterisasi

Membran PU yang dihasilkan dikarakterisasi baik sifat kimia, fisik, mekanik serta kinerjanya pada proses osmosa balik.

Sifat kimia ditentukan dengan analisis struktur dan penentuan indeks ikatan hydrogen

menggunakan alat infra merah (IR). Spektrum IR yang dihasilkan menunjukkan bahwa hilangnya serapan untuk gugus $-CO$ dari NCO pada bilangan gelombang 2272.9 cm^{-1} dan gugus $-OH$ pada bilangan gelombang $3100 - 3300\text{ cm}^{-1}$, baik untuk membran dengan atau tanpa proteksi. Sebagai hasilnya timbul serapan khas pada bilangan gelombang 3365 cm^{-1} , yang merupakan serapan untuk gugus uretan. Hasil ini menunjukkan bahwa proses polimerisasi pada sintesa membran PU telah berlangsung dengan baik dan sempurna. Dari spektrum juga tampak bahwa serapan terhadap gugus uretan untuk membran dari asam lemak yang melalui proteksi lebih tajam dan lebar dibandingkan dengan membran dari asam lemak hasil hidrasi tanpa proteksi. Hal ini membuktikan bahwa proses proteksi menghasilkan gugus $-OH$ yang lebih banyak sehingga gugus uretan yang terbentuk juga lebih banyak. Indeks ikatan hidrogen (HBI) dari membran dapat ditentukan, yaitu hubungan antara absorban dari puncak karbonil ikatan hidrogen terhadap puncak karbonil bebas. Dari gambar tersebut tampak bahwa HBI membran dari asam lemak terproteksi lebih besar dibandingkan dengan yang hidrasi, yaitu 0,49 dan 0,43. Fenomena ini disebabkan karena interaksi antar molekul dalam molekul membran tersebut lebih besar pada bagian keras dari pada bagian lunaknya, atau dengan kata lain partisipasi gugus karbonil pada ikatan hidrogen bagian keras lebih besar pada membran PU hasil proteksi.

Sifat fisik ditunjukkan oleh analisis terhadap temperatur transisi gelas dan temperatur dekomposisi menggunakan alat DTA. Dari tabel 2 tampak data analisis yang menunjukkan bahwa membran PU dari asam lemak yang terproteksi terlebih dahulu memiliki Tg lebih kecil dari pada asam lemak yang terhidrasi, hal ini disebabkan oleh kandungan gugus $-OH$ yang lebih banyak sehingga membran yang dihasilkan lebih fleksibel, yang menyebabkan perubahan dari *glassy* menjadi fasa *rubbery* lebih mudah, namun lebih sulit terdekomposisi. Kemungkinan lain disebabkan oleh tahapan polimerisasi yang terjadi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Jhurry dan Alain (1997), di mana temperatur transisi gelas dari suatu polimer turun akibat proteksi gugus hidroksi, hal ini dapat dimaklumi karena berkurangnya ikatan hidrogen. Namun dalam penelitian ini, gugus hidroksi setelah diproteksi dibebaskan kembali. Membran dari asam lemak hasil hidrasi memiliki ikatan yang kuat sehingga Tg nya lebih besar, hal ini sama dengan polimer dari minyak kedele yang didapat

oleh Wool et al. (2000). Sebaliknya temperatur dekomposisi dari membran terproteksi lebih besar dibandingkan dengan membran tanpa proteksi, karena pembentukan ikatan silang dan *hard segment* yang lebih banyak di dalam membran terproteksi, sehingga memerlukan energi yang lebih besar. Hasil ini didukung oleh data analisis XRD, di mana persen kristalinitas membran terproteksi mempunyai nilai 70,48, lebih besar dibandingkan membran tanpa proteksi yaitu 60,34. Nilai ini menunjukkan bahwa membran mempunyai sifat yang kuat dan elastis, yang dapat digunakan sebagai membran osmosa balik.

Data kekuatan mekanik dan kekuatan jebol dapat dilihat pada tabel 3. Hasil pengukuran sifat mekanik menunjukkan bahwa membran PU dari asam lemak terproteksi mempunyai tegangan yang lebih kecil dibandingkan dengan membran PU tanpa proteksi. Hal ini disebabkan karena membran tersebut berasal dari bahan baku yang memiliki $-OH$ lebih besar, sehingga memiliki ikatan silang yang lebih banyak yang menyebabkan sifatnya lebih getas, sehingga lebih mudah dipatahkan. Sifat ini didukung oleh nilai regangannya yang lebih kecil untuk membran MPU terproteksi. Sebaliknya untuk menjebolkan membran ini jauh lebih sulit karena banyaknya ikatan silang, sehingga membutuhkan energi yang besar.

Tabel 2 Data analisis DTA dan XRD

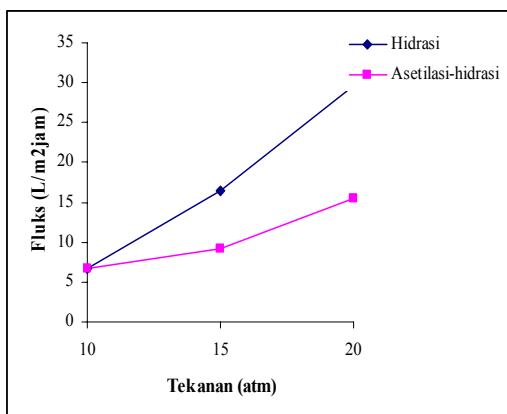
Membran Hasil	DTA		Kristalinitas (%)
	Tg (°C)	TD (°C)	
Hidrasi	127,02	401,55	60,34
Asetilasi-Hidrasi	113,75	410,59	70,48

Tabel 3 Data analisis kekuatan mekanik

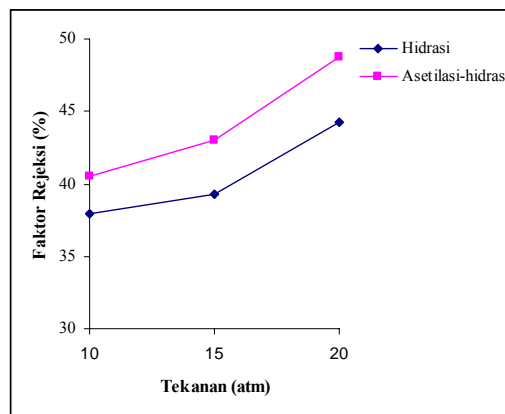
Membran Hasil	Uji Tarik		Uji Jebol (Kpa)
	Tegangan (Mpa)	Regangan (%)	
Hidrasi	328,45	2,29	767
Asetilasi-Hidrasi	231,75	1,99	860

Osmosa Balik

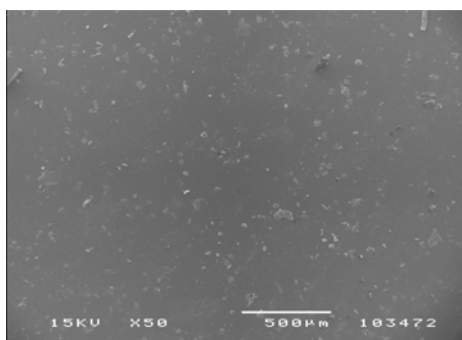
Membran yang dihasilkan di atas diplikasikan pada proses osmosa balik, menggunakan larutan dam natrium klorida 2500 ppm sebagai larutan umpan, dengan tekanan bervariasi dari 10 to 20 atm.



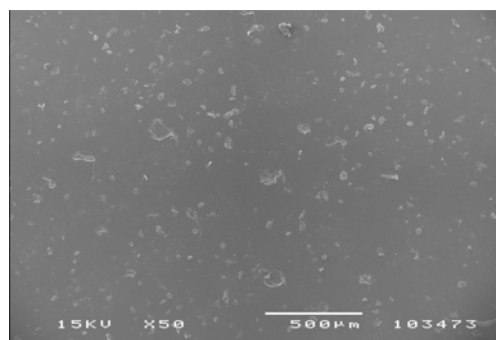
Gambar 1 Flux terhadap tekanan osmosa balik



Gambar 2 Faktor rejeksi terhadap tekanan pada osmosa balik



(a)



(b)

Gambar 3 Morfologi membran PU dari asam lemak bebas hasil foto SEM sebelum (a) dan sesudah (b) proses osmosa balik

Dari Gambar 1 dan 2 tampak bahwa hasil optimum dari proses osmosa balik diperoleh oleh membran tanpa proteksi dengan nilai fluks 29,61 L/m² jam dan faktor rejeksi 44,3 %. Hal ini menunjukkan bahwa membran yang mengalami proses proteksi mempunyai pori yang lebih rapat sehingga menghasilkan fluks yang lebih kecil dan faktor rejeksi yang lebih besar. Dari hasil penelitian ini tampak bahwa hasil yang diperoleh belum maksimum, oleh karena itu perlu dicari cara alternatif untuk menghasilkan monomer pada pembuatan membran PU.

Analisis permukaan membran menggunakan SEM yang terlihat pada Gambar 3, di mana tampak bahwa morfologi permukaan membran homogen dan rata sebelum dan sesudah diaplikasikan pada proses osmosa balik. Hal ini menunjukkan bahwa membran ini dapat digunakan pada tekanan yang besar dan waktu yang panjang.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan awal terhadap asam lemak bebas mempengaruhi sifat-sifat membran PU yang dihasilkan.
2. Kondisi optimum pada sintesa membran PU adalah 1.2 : 0,41 (mol/mol) untuk membran dari asam lemak terhidrasi tanpa proteksi dan 1.2 : 0,52 (mol/mol) untuk yang terproteksi asetilasi.
3. Kinerja optimum membran diperoleh dari membran tanpa proteksi, dengan nilai fluks sebesar 29,61 L/m² jam dan faktor rejeksi 44,3 %. Membran yang dihasilkan bersifat homogen, elastis dan kuat.

5. Daftar Pustaka

- [1]. Ramanathan L.S., Sivaran S., Munmaya K. M., Polyurethanes, Polymer Data Handbook, Oxford University Press Inc., USA, 870 – 877 (1999).
- [2]. Woods G., The ICI Polyurethanes Book, ICI Polyurethanes & John Wiley & Son, Netherlands, 7-41, 249-284 (1987).
- [3]. Odian G. (1991), Principles of Polymerization, John Wiley & Son, Inc., USA, 1 – 37.
- [4] Cheng L.P., Huang Y.S., and Young T.H., Effect of the Temperatur of Polyurethane Dissolution on the

- Mechanism of Wet-casting Membran Formation, *European Polymer Journal*, 39, 601-607 (2003).
- [5] Sinha A.K. and B.K. Mandal, Thin Polyurethane Films of Polyhydroxysilicon Phtalocyanine and Bis-phtalocyanine Derivates, *Polymer Journal*, Vol. 27. No. 11, 1079 – 1084 (1995).
- [6]. Xie H. Q and J.S. Guo, Room Temperatur Synthesis and Mechanical Properties of Two Kinds of Elastomeric Interpenetrating Polymer Networks based on Castor Oil, *European Polymer Journal* 38, 2271-2277 (2002).
- [7] Lu Y., L. Zhang, Morphology and Mechanical Properties of Semi Interpenetrating Polymer Networks from Polyurethane and Benzyl Konjac Glucomanan, *Polymer* 43, 3979-3986 (2003).
- [8] Huang J. and L. Zhang, Effect of NCO/OH ratio on Structure and Properties of Graft – Inter Penetrating Polymer Networks from Polyurethane and Nitrolignin, *Polymer* 43, 2287-2294 (2002).
- [9] Rizk A.M. and A.S. Al- Nowaihi, *The Phytochemistry of The Horticultural Plants of Qatar*, Qatar , The Scientific and Applied Research Center, University of Qatar, The Alden Press, Ltd., (1989).
- [10]. James A.D., *CRC Handbook of Medicinal Herbs*, Florida, CRC Press Inc., (1985).
- [11]. Trost B.T., Ian F., and Steven V.L., *Comprehensive Organic Synthesis, Selective, Strategy, and Efficiency in Modern Organic Chemistry, Volume 7 Oxidation*, Pergamon Press, USA, (1994).
- [12] Marlina, N.M. Surdia, C.L. Radiman, S. Achmad, Sintesis Membran Poliuretan Dari Asam Lemak Bebas Teroksidasi Dan Tolulen Diisosianat, *Prosiding Seminar MIPA 2, ITB, Bandung*, (2004).
- [13]. Stropnik C. and V. Kaiser, *Polymeric Membran Preparation by Wet Phase Separation : Mechanism and Elementary Process*, *Desalination* 145, 1-10 (2002).
- [14] *Annual Book of ASTM Standards* (1976), D961, Washington, D.C., USA.
- [15] Wool R.P. (2002), *Composites from Soybean*, Tenth European Conference on Composite Materials (ECCM-10), Brugge, Belgiu

Distribution of Fatty Acids in the Mawddach Estuary, United Kingdom

Masni Mohd Ali

School of Environmental & Natural Resource Sciences
Faculty of Science & Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi
Selangor, Malaysia
email: masni@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Fatty acids in surface sediments were analysed from 25 sampling sites in the Mawddach Estuary, UK. A total of 32 different fatty acids were quantified as their methyl esters using GC-MS techniques. Individual compounds, ratios and multivariate statistical methods were used to identify the sources and their spatial variation. The sediments towards the sea were rich with marine and phytoplankton markers (e.g. 16:1 ω 7 and short chain saturated fatty acids) whereas those near the sewage discharge points were comprised of odd chain length fatty acids, their branched derivatives and 18:1 ω 7 acid, linking these areas with bacterial biomass. The terrestrial influence could be seen in the freshwater sediments through the use of long chain saturates (24 and 25 carbon). Multivariate statistical technique (PCA) was used to interpret the data. PCA was found to be useful in this case. PCA showed the compounds separation from marine and bacterial derived compounds to the terrestrially derived fatty acids.

Keywords: fatty acids, Mawddach Estuary, biomarkers, PCA

1. Introduction

Since the majority of organic carbon in the oceans is held within the sediments, and approximately 80% of sediments on earth are trapped in the continental margins, the processes occurring in coastal areas are of vital importance in the global carbon cycle (Grimalt and Albaiges, 1990). Coastal margins are dynamic regions where carbon inputs are typically derived from both terrestrial and marine sources. A river estuary and its adjoining shelf constitute a complex mixing zone and receives organic matter from diverse sources such as continental plants, phytoplankton, zooplankton, bacteria, anthropogenic, atmosphere fallout *etc.* The lipid biomarker approach can give valuable insights concerning the origin of these diverse sources of organic matter (Saliot *et al.*, 1991; Laureillard and Saliot, 1993). Therefore the study of the organic inputs to these systems both in bulk terms and at the molecular level is

important to the distribution and fate of organic material as these are regions of both high pollutant input and resource use. Consequently, understanding the fate and transport of lipid biomarkers in estuarine environments is essential to maintaining the health of these invaluable environments (Countway *et al.*, 2003). The lipid biomarker used in the present study is fatty acids. These lipid biomarkers have been shown to provide good source identification for organic matter in several studies around the world (e.g. Thoumelin *et al.*, 1997; Carrie *et al.*, 1998; Mudge *et al.*, 1998; Birgel *et al.*, 2004; Tolosa *et al.*, 2004)

The Mawddach Estuary is situated approximately 52° 43'N and 4° 00'W on the west coast of Wales and lies within the Snowdonia National Park (Figure 1). It has an area of 1000 ha and a coastline of 33 km. The catchment is drained by the Afon Wnion and Afon Mawddach, which converge just below their tidal limits. It is a wide estuary with

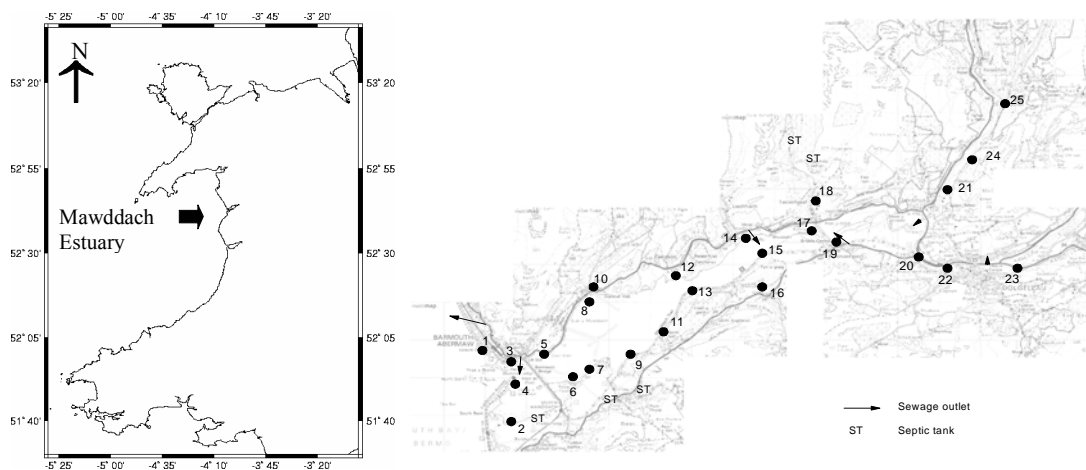


Figure 1: Location of sampling sites and sewage outfalls throughout the Mawddach Estuary

extensive sandflats throughout its length and 220 ha of salt marsh (Burd, 1989). Mawddach Estuary opens into Cardigan Bay at Barmouth, which is a popular seaside town with a sheltered harbour for small fishing boats. A spit of sand and shingle (Fairbourne sands) protects the mouth of the estuary.

The major goal of this study was to identify and distinguish the distribution of fatty acids throughout the Mawddach Estuary using individual compounds, ratios and multivariate statistical method.

2. Materials and methods

Surface sediment samples (the top 4 cm) were collected from 25 sites around the Mawddach Estuary (Figure 1). The samples were stored at 4°C until further analysis.

Extraction

The samples were stored at 4°C before the extraction. Samples were extracted immediately after they were collected. The storage condition *i.e.* in the fridge is similar to the environmental condition. No change of colour was observed in related to the oxygen usage. Extraction of sediment was carried out in three stages: sediment reflux, liquid-liquid separation and derivatisation. The methods used for extraction and purification are adapted from procedures found in the literatures (Mudge and Norris, 1997; Mudge *et al.*, 1998). Experiments with spiked reference materials have shown that these methods release >95% of the fatty acids, fatty alcohols and sterols from sediments and full recovery is assumed here (Mudge and Norris, 1997; Pereira, 1999).

Approximately 30-40 g wet weight of sediment was hydrolysed with 50 ml of 6% *w/v* potassium hydroxide in methanol (Rathburns). The samples were refluxed for 3.5 hours which gave >95% recovery for Pereira (1999). The reflux samples were centrifuged (Hermle Z 230 A) at 2500 r.p.m. for 5 minutes. The supernatant was then funnelled into the separating flask. The sterols, fatty alcohols, aliphatic and aromatic hydrocarbons were extracted into hexane. The remaining aqueous-methanol phase contained fatty acids and was acidified using the 10% hydrochloric acid (HCl) and transferred into the separating funnel. Twenty ml of dichloromethane:hexane (1:4) solution and 10 ml of UHQ water were added to separate the fatty acids fraction. The mixture was shaken and the lower phase was removed. The procedure was repeated once again. The solvent fractions were combined, concentrated by a combination of rotary evaporation and nitrogen blow down to dryness.

Boron trifluoride (BF₃) was used to derivatise the fatty acid samples. The chemical reaction involves is the hydrogen atom from the carboxyl end of the fatty acid is replaced by a methyl group forming a methyl ester and analyse by gas chromatography-mass spectrometry (Fisons MD-800).

Gas Chromatography - Mass Spectrometry

A computerised gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) (Fisons MD800) was used to analyse fatty acids of the sediments with an on-column injection and secondary cooling. The compounds are carried through the column by helium carrier gas (99.996%

pure with a flow rate 1 ml min^{-1} and column pressure of 50 kPascal) after the sample is vaporised. Characteristic ions were produced by the bombardment of compounds by electrons and they are separated according to their mass:charge (m/z) ratio. Masslab, which is a GC-MS program, was used to record and display the mass spectra. A BPX-70 (SGE) column was used for fatty acid methyl esters. It is a very polar, bonded phase column with a 50 m length, 0.33 mm internal diameter and $0.25\mu\text{m}$ film thickness. The temperature program started at 80°C , increasing at $40^\circ\text{C min}^{-1}$ to 160°C , then at $0.5^\circ\text{C min}^{-1}$ to 170°C and finally at $10^\circ\text{C min}^{-1}$ to a maximum of 250°C for 8 minutes. Calibration with standards of known concentration was carried out in order to quantify the peaks obtained during the analysis. Tricosanoic acid methyl ester (23:0) was used as an internal standard.

Quality Assurance Procedures

Standard method and techniques were adopted whenever possible during this work. In the laboratory, analyses were carried out in Decon-90 washed glassware. The efficiency of the whole extraction process was confirmed by repeat reflux of some sediment samples; no further fatty acids could be detected in these later extractions. Blanks and calibration standards were used throughout the GC injections. A blank was injected first and followed by the calibration standard. Five samples were injected afterwards, and followed by the blank and calibration standard again.

Random samples were extracted three times to test the reproducibility of the extraction. The mean and standard deviation of fatty acid 18:1 ω 7, saturated alcohol 18:0 and cholesterol from sample 1 in the Mawddach Estuary are $1426 \pm 45\text{ ng g}^{-1}$, $24.84 \pm 0.83\text{ ng g}^{-1}$ and $1342 \pm 52\text{ ng g}^{-1}$ respectively. Therefore, the reproducibility of the extraction has been found to be better than 90% for all three classes of compound. Procedural blanks were also analysed and no compounds of interest were measured in any sample. All glassware and Teflon-lined caps used in these analyses were rinsed with organic solvents prior to work.

Multivariate statistical technique

In this study, the results were investigated by multivariate statistical analysis such as Principal Component Analysis (PCA) to extract

and quantify individual compound sources from complex mixtures of compounds collected from the estuary. A SIMCA-P program from Umetri (Sweden) was used to perform the PCA in order to determine the biomarker distributions throughout the sampling sites. Proportion data, added 0.001 with log transformation were used for the analysis.

3. Results

The results were expressed in ng g^{-1} WW due to lack of sample for dry weight analysis. Arrows were applied to the figures to show the sewage outfalls and ST for the septic tanks. A total of 32 fatty acids were identified from the 25 sampling sites with 16:0 and 18:0 the two most abundant. Figure 2 illustrates the distribution of the monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (expressed as a percentage of the total fatty acids concentration), which are similar to each other (correlation coefficient $r=0.58$, $p<0.01$). High values of monounsaturated fatty acids (>30% of total fatty acids) can be seen at S1. The unsaturated fatty acids together with the short chain saturated fatty acids have high concentrations at stations towards the sea (S1 and S2) and are low at stations where sewage is likely to have a major influence on sedimentary organic matter (S3, S4, S6, S7, S9, S14 and S22) and at freshwater end of the estuary (S24 and S25). Three monounsaturated 16-carbon fatty acids (16:1 ω 7, 16:1 ω 9 and 16:1 ω 11) were identified in this study. 16:1 ω 7 contributes more than 10% of the total fatty acids in S1 and S2, which are marine in nature.

The distribution of percentage branched fatty acids (Figure 3) is the inverse of the distribution of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids ($r=-0.32$, $p<0.01$). High percentages (>15% of total fatty acids) were generally seen at S3, S4, S5, S6, S7, S9, S12, S14, S21 and S22 that are near the sewage discharge points, indicating those areas had increased bacterial biomass. This observation is supported by the low concentration of polyunsaturated fatty acids in those stations.

The odd/even ratio (Figure 4) shows a similar distribution as the percentage branched fatty acids reinforcing their link with bacterial biomass. Fatty acid 18:1 ω 7 has also been used as bacterial biomarker (Saliot *et al.*, 1991). The concentration of this fatty acid was strongly

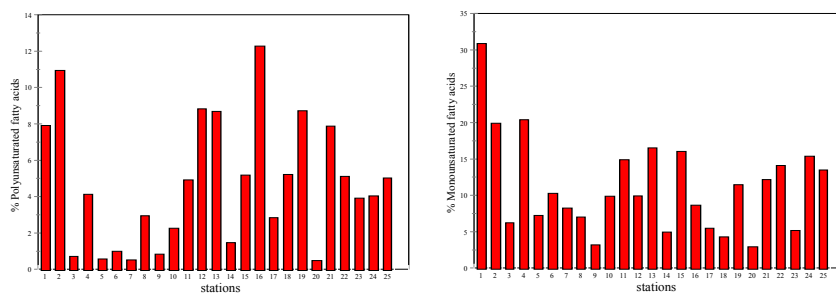


Figure 2: Percentage of polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in Mawddach estuary. Branched chain fatty acids; principally *iso* and *anteiso* odd chain length compounds are commonly used as bacterial biomarkers because of their strong predominance in micro organisms (Saliot *et al.*, 1991)

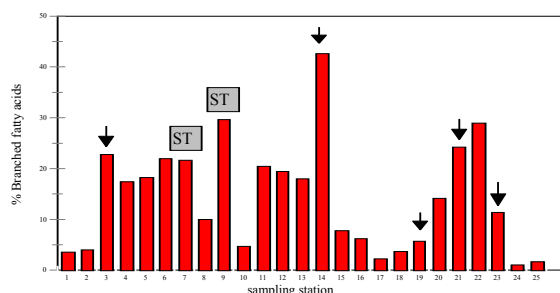


Figure 3: Percentage of branched fatty acids in Mawddach estuary

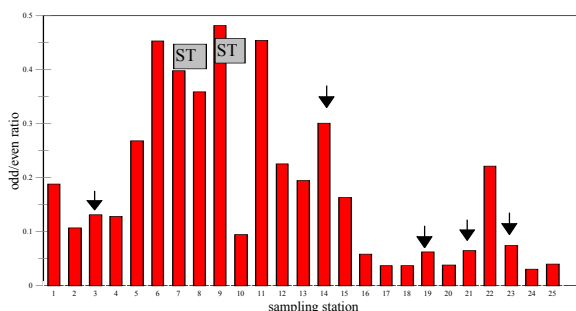


Figure 4: Distribution of odd/even ratio of fatty acids throughout the Mawddach sampling stations

correlated to branched fatty acids and total concentrations of odd chain fatty acids with correlation factors of 0.81 and 0.66 respectively ($p < 0.001$).

Only two long chain components were identified in this study, 24:0 and 25:0. These two saturated fatty acids were correlated strongly with each other with correlation coefficient of 0.76 ($p < 0.001$). The distribution of these compounds is consistent with freshwater sites (S16, S18, S24 and S25). The short/long ratios ($\sum 12:0 - 20:0 / \sum 21:0 - 25:0$) in Figure 5 indicate increasing values from the freshwater samples to the marine samples.

Principal component analysis

All compounds were used to perform PCA. Proportion data, added 0.001 with log transformation were used for the analysis. All the data were mean centred to unit variance to remove the concentration effect. PC1 and PC2 account for 27.5% and 20.6% of the variance in the data. The plot of the loadings on PC1 and PC2 (Figure 6a) indicate the geochemical sources. Marine markers such as 12:0, 13:0 and 14:0 fatty acids are positively loaded on PC1, whereas the terrestrial fatty acids are negatively loaded. The bacterial derived fatty acids are also positively loaded on PC1. All the

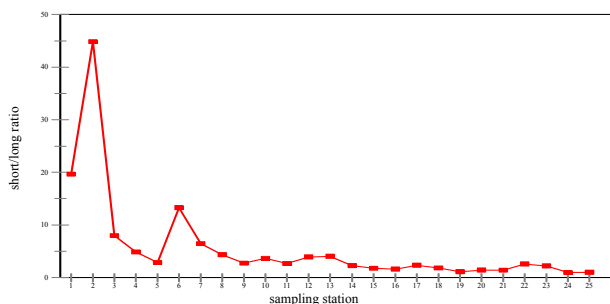


Figure 5: Change in short/long ratio of fatty acids throughout the Mawddach sampling stations

polyunsaturated fatty acids representing the algal input are positively loaded on PC2. PCA carried out using proportion data with log transformation (+0.001) shows the clear separation compared to the other sets of data. It can be seen that 17:0 acid behaves like "marine" derived compound in most cases, while the 15:0 acid behaves like branched fatty acids representing the "bacterial" marker. Monounsaturated fatty acids like 18:1 ω 9, 18:1 ω 11, 16:1 ω 7, 16:1 ω 9 and 16:1 ω 11 also behave like "algae" derived compounds but not as well defined as others.

Figure 6b shows the scores of the first two components based on the proportion data (+0.001) with log transformation as the PCA carried out with this set of data showed clear compound separation. Terrestrial organic matter dominates samples projected on the left side of the diagram (terrestrial axis). Samples projected towards the right side of the diagram are influenced with algae and marine markers showing that sample 1 and 2 have the most marine derived compounds. Meanwhile samples that projected negatively on PC2 contain the greatest amount of bacterial derived fatty acids (bacterial axis).

4. Discussion

Estuaries occupy a unique position between land and ocean for material exchange and biogeochemical processing of organic matter. The origin of organic matter in estuaries is complex, and sources include: a) *in situ* primary production, b) terrestrial material transported by river and groundwater flow, land runoff, and atmospheric deposition, c) anthropogenic sources such as wastewater treatment plants, industrial plants, etc., and d) material from the coastal ocean transported via

tidal exchange (Mannino and Harvey, 1999). Fatty acids have been used to evaluate sources of organic matter in various depositional environments (Volkman, 1986; Volkman *et al.*, 1987; Wakeham and Lee, 1989; Mudge *et al.*, 1999). In this study, 25 surface samples were collected from the Mawddach Estuary to assess the spatial variability.

Long chain fatty acids and fatty alcohols are generally associated with the higher plants and are considered as indicator of terrigenous inputs (Fukushima and Ishiwatari, 1984; Carrie *et al.*, 1998). However longer chain fatty acids may also be present in some diatoms (Volkman, 1986; Volkman *et al.*, 1998). Long chain fatty acids were found in all samples collected. Higher concentrations of these compounds can be seen in the freshwater samples compared to the marine samples in the Mawddach Estuary. This was probably the result of the physical processes of dispersion and deposition of the riverine sediments combined with the selective diagenesis (Mudge and Norris, 1997). The same results were found from the Peru sediments (Volkman *et al.*, 1987). Fukushima and Ishiwatari (1984) also found high concentration of long chain allochthonous materials in the surficial sediments of Tokyo Bay. These relatively high concentrations of long chain fatty acids in marine sediments were controlled by the input as well as by the degradation of organic matter (Westerhausen *et al.*, 1993).

Fukushima and Ishiwatari (1984) used the L/H ratio by assuming that chain length distributions may reflect input of fatty acids and fatty alcohols. The short/long ratios (similar to L/H ratio) for fatty acids in the Mawddach samples were high in the marine samples and low in the freshwater samples

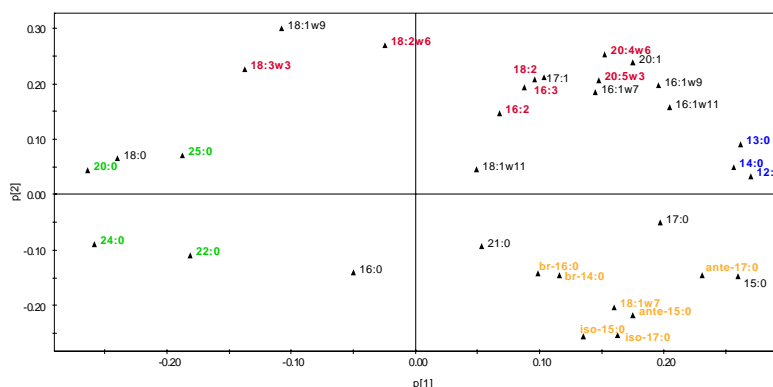


Figure 6a: The loadings for each fatty acid on PC1 and PC2 in the PCA model

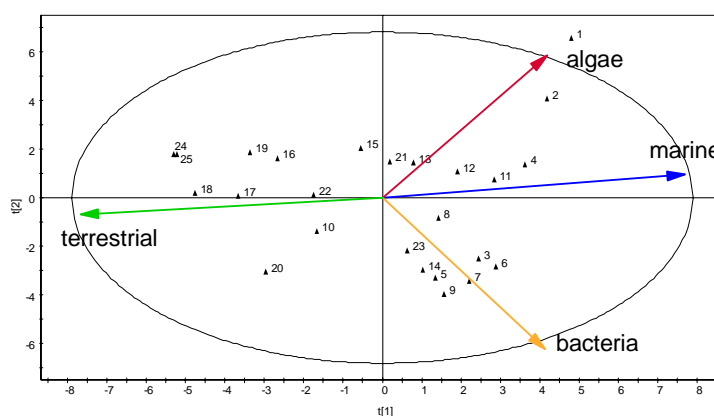


Figure 6b: The PCA scores for the first two components

(Figure 5). These ratios strongly imply that freshwater samples (above the tidal limit) are rich with compounds derived from terrestrial plant sources.

The fatty acids detected in all marine samples were predominantly marine in origin. Similar distributions have been observed in other marine systems (Carrie *et al.*, 1998; Mudge *et al.*, 1999). Short chain saturated fatty acids are considered to originate from algae (Carrie *et al.*, 1998; Rohjans *et al.*, 1998; Mudge *et al.*, 1999). The saturates were dominated by 14:0, 16:0 and 18:0 acids. Fatty acids such as 16:1 ω 7, 18:4 ω 3 and 20:5 ω 3 are derived primarily from phytoplankton as these fatty acids are major lipids in many species of diatoms (Volkman *et al.*, 1989; Dunstan *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994). The monounsaturated fatty acid, 16:1 ω 7 is diatom derived (Carrie *et al.*, 1998; Mudge *et al.*, 1999) and can be found in all samples in high concentration, especially in marine samples. In the Mawddach samples, high value of unsaturated fatty acids together with the short chain saturated fatty acids can be seen in

marine samples while low concentrations were present in the freshwater samples (Figure 3.3). Similar results were observed by Goñi *et al.* (2000) at Beaufort Shelf, which was dominated by monounsaturated 16:1, followed by the short chain fatty acids (16:0, 14:0 and 12:0 acids). These compounds are not different from micro algae such as diatoms and green algae (Goñi and Hedges, 1995). Hence, the predominance of 16:1 ω 7, which contributes more than 10% of the total fatty acids in S1 and S2 likely, is indicative of a marine diatom source. The 16:0 and 14:0 fatty acids also have been observed to be important constituents in Laptev Sea sediments, where they have been attributed to microalgal inputs, mainly diatoms (Zegouagh *et al.*, 1996).

Branched fatty acids and fatty alcohols (principally *iso* and *anteiso* odd chain length compounds) are commonly encountered in bacterial lipids (Parkes, 1987; Saliot *et al.*, 1991; Thoumelin *et al.*, 1997). Therefore these compounds are useful indicators of bacterial lipid contribution or bacterial biomass. The odd/even ratios of fatty acids have a similar

distribution with the percentage of branched fatty acids demonstrating their link with bacterial biomass. The same results were found with samples from the Mawddach Estuary (Figure 4). Mudge *et al.* (1998) found similar distribution of branched fatty acids and the odd/even ratios in the Ria Formosa lagoon, Portugal. In the Mawddach samples, high concentration of branched fatty acids can be seen at sampling sites situated near the sewage discharge points. The fatty acid, 18:1 ω 7 that was usually associated with cell walls has also been used as bacterial biomarker in sediments (Saliot *et al.*, 1991; Thoumelin *et al.*, 1997; Mudge *et al.*, 1995; Mudge *et al.*, 1998). In the Mawddach samples, concentrations of this fatty acid were strongly correlated with branched fatty acids and the total concentration of odd chain fatty acids.

Principal component analysis provides a comprehensive approach to better elucidate the origins (e.g. terrestrial, marine/algal, bacteria, sewage) of the biomarker being measured in this study. In this study PCA carried out using the proportion data, added 0.001 (log transformed) tends to separate the fatty acids according to their geochemical source. PCA separates the fatty acids by primary source: marine, bacteria and terrestrial plants. Polyunsaturated fatty acids, short chain acids and 16:1 ω 7 acid principally have a marine and algal source in the Mawddach Estuary (Figure 6a). Branched fatty acids clearly cluster together. Bacteria are the major source of these compounds (Parkes, 1987; Killops and Killops, 1993). 18:1 ω 7, which is also abundant in bacteria, was grouped with the branched fatty acids reinforcing their link to the bacterial biomass. PCA for fatty acid compounds also separates the samples according to the geochemical source of the compounds. In the Mawddach Estuary, PCA clearly separates the freshwater samples and the marine samples (Figure 6b). Bacterial derived compounds influenced the samples collected near the sewage discharge points. PC1 separates the marine and bacterial fatty acids from the long chain compounds.

5. Conclusions

The marine samples are characterised by relatively high concentration of short chain fatty fatty acids. Meanwhile the freshwater samples are characterised by an increasing

dominance of terrestrially derived materials with high concentrations of long chain fatty acids. Samples that are near the sewage discharge points have high concentration of bacterial input fatty acids. Multivariate analysis overcomes the difficulty that biomarkers often are not specific. With a multimarker approach, biomarkers may be clearly interpreted. PCA confirmed the above observations with PC1 and PC2 indicating biogeochemical sources. Three distinct regions in PC diagrams could be identified; terrestrial markers are clearly separated from bacterial/sewage and marine markers.

6. References

- Birgel, D., Stein, R. and Hefter, J. (2004) Aliphatic lipids in recent sediments of the Fram Strait/Yermak Plateau (Arctic Ocean): composition, sources and transport processes. *Mar. Chem.* **88**, 127-160.
- Burd, F. (1989) *The saltmarsh survey of Great Britain. An inventory of British saltmarshes.* Peterborough, Nature Conservancy Council, (Research and survey in nature conservation, No. 17).
- Carrie, R. H., Mitchell, L. and Black, K. D. (1998) Fatty acids in surface sediments at the Hebridean shelf edge, west of Scotland. *Org. Geochem.* **29**, 1583-1593.
- Colombo, J. C., Silverberg, N. and Gearing, J. N. (1997) Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough: I - fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons in rapidly settling particles. *Org. Geochem.* **25**, 211-225.
- Countway, R.E., Dickhut, R.M. and Canuel, E.A. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. *Org. Geochem.* **34**, 209-224.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J. -M. and Jeffrey, S. W. (1994) Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochem.* **35**, 155-161.
- Fukushima, K. and Ishiwatari, R. (1984) Acid and alcohol compositions of wax esters in sediments from different environments. *Chem. Geol.* **47**, 41-56.
- Goñi, M. A. and Thomas, K.A. (2000) Sources and transformation of organic matter in surface soils and sediments from a tidal estuary (North Inlet, South Carolina, USA). *Estuaries* **23**, 548-564.
- Grimalt, J.O. and Albaiges, J. (1990) Characterization of the depositional of the Ebro

- Delta (western Mediterranean) by the study of sedimentary lipid markers. *Mar. Geol.* **95**, 207-224.
- Hama, T. (1991) Production and turnover rates of fatty acids in marine particulate matter through phytoplankton photosynthesis. *Mar. Chem.* **33**, 213-227.
- Killops, S.D. and Killops, V.J. (1993) *An Introduction to Organic Geochemistry*. Longman Scientific and Technical. New York. 265 p.
- Laureillard, J. and Saliot, A. (1993) Biomarkers in organic matter produced in estuaries: a case study of the Krka estuary (Adriatic Sea) using the sterol marker series. *Mar. Chem.* **43**, 247-261.
- Mannino, A. and Harvey, H. R. (1999) Lipid composition in particulate and dissolved organic matter in the Delaware Estuary: Sources and diagenetic patterns. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 2219-2235.
- Mudge, S. M., Bebianno, M. J., East, J. A. and Barreira, L. A. (1999) Sterols in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Wat. Res.* **33**, 1038-1048.
- Mudge, S. M., East, J. A., Bebianno, M. J. and Barreira, L. A. (1998) Fatty acids in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Org. Geochem.* **29**, 963-977.
- Mudge, S. M. and Norris, C. E. (1997) Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. *Mar Chem.* **57**, 61-84.
- Parkes, R. J. (1987) Analysis of microbial communities within sediments using biomarkers. In: Fletcher, M., Gray, T. R. G. and Jones, J. G. (Eds.). *Ecology of Microbial Communities*. Cambridge University Press, London, 440 pp.
- Pereira, M. G. S. (1999) *Bacterial degradation of linseed and sunflower oils in salt marsh sediments*. PhD Thesis. University of Wales, Bangor. 199p.
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y. (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* **30**, 972-979.
- Rohjans, D., Brocks, P., Scholz-Böttcher, B. M. and Rullkötter, J. (1998) Lipid biogeochemistry of surface sediments in the Lower Saxonian Wadden Sea, northwest Germany, and the effect of the strong winter 1995-1996. *Org. Geochem.* **29**, 1507-1516.
- Saliot, A., Laureillard, J., Scribe, P. and Sicre, M.A. (1991) Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Mar. Chem.* **36**, 233-248.
- Smith, D.J., Eglinton, G. And Morris, R.J. (1983) The lipid chemistry of an interfacial sediment from the Peru Continental Shelf: Fatty acids, alcohols, aliphatic ketones and hydrocarbons. *Geochim. Cosmochim. Acta* **47**, 2225-2232.
- Thoumelin, G., Bodineau, L. and Wartel, M. (1997) Origin and transport of organic matter across the Seine estuary: Fatty acid and sterol variation. *Mar. Chem.* **58**, 59-71.
- Tolosa, I., Vescovoli, I., LeBlond, N., Marty, J-C, de Mora, S. and Prieur, L. (2004) Distribution of pigments and fatty acid biomarkers in particulate matter from the frontal structure of the Alboran Sea (SW Mediterranean Sea). *Mar. Chem.* **88**, 103-125.
- Volkman, J.K. (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* **9**, 83-99.
- Volkman, J. K., Barrett, S. M., Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L. and Gelin, F. (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org. Geochem.* **29**, 1163-1179.
- Volkman, J.K., Farrington, J.W. and Gagosian, R.B. (1987) Marine and terrigenous lipids in coastal sediments from the Peru upwelling region at 15°S: Sterols and triterpene alcohols. *Org. Geochem.* **11**, 463-477.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. and Garland, C.D. (1989) Fatty acids and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.* **128**, 219-240.
- Westerhausen, L., Poynter, J., Eglinton, G., Erlenkeuser, H. and Sarnthein, M. (1993) Marine and terrigenous origin of organic matter in modern sediments of the equatorial east Atlantic: the $\delta^{13}\text{C}$ and molecular record. *Deep Sea Res. I* **40**, 1087-1121.
- Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C. and Saliot, A. (1996) OM sources and early diagenetic alterations in Arctic surface sediments (Lena River delta and Laptev Sea, Eastern Siberia): I. Analysis of the carboxylic acids released via sequential treatments. *Org. Geochem.* **24**, 841-857.



Characterization of microemulsion-derived conductivity polyaniline-coated Cadmium Sulphide nanocomposites

Khiew Poh Sim^a, Huang Nay Ming^a, Shahidan Radiman^a, Md Soot Ahmad^b

^aSchool of Applied Physics, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

^bSchool of Chemistry & Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

Abstract

Polyaniline-coated Cadmium Sulphide nanocomposites have been synthesized employing the microemulsion processing technique. Microemulsion contains a dynamic structure of water nanodroplets have been utilized as the medium for the chemical reaction to occur when desirable reactants collide with each other. The synthesized polyaniline-coated CdS nanocomposites were characterized by UV-Vis absorption, FTIR, X-ray diffraction and Energy Filtered Transmission Electron Microscopy (EFTM). The appearance of characteristic absorption band around 330, 450 and 800 nm in UV-Vis spectra confirm the formation of conductivity emeraldine salt. The lower intensity polaron absorption for polyaniline/CdS nanocomposites in the spectra indicates the doping state of the polymer has been improved. The very weak vibration peak of CdS bonding at 405 cm^{-1} is observed in FTIR spectra. These results reveal the concentration of CdS in nanocomposites is very low due to the formation of core-shell structure. The size of the nanocomposites is estimated to be in the range of 10-20 nm as observed in the TEM micrograph. The powder XRD pattern of the products confirms the formation of cubic CdS nanocrystal in the nanocomposites.

Paper is not available

Aksiom-Aksiom Awal Kristalografi

Mohammad Alinor bin Abdul Kadir

Pusat Pengajian Sains Matematik,
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia.

Abstrak

Walaupun Pliny, sekitar 2000 tahun yang lepas, merupakan sarjana pertama di dunia yang diketahui menulis dengan panjang lebar tentang sifat-sifat pada objek kristal, namun hukum-hukum dasar berkenaan kristal hanyalah diungkapkan seawalnya selepas 1600. Johannes Kepler pada 1611 sewaktu membuat penelitian terhadap salji yang berbentuk heksagonal menyatakan bahawa "struktur kristal yang sebegitu mungkin disebabkan daripada tersusunnya secara geometri unit-unit kecil secara teratur". Steno pula pada 1669 mengatakan bahawa "sudut diantara bahagian-bahagian tertentu pada suatu kristal selalunya tetap". Hukum Steno ini diuji kebenarannya pada 1783 melalui ujian Contact Goniometer dan dengan lebih tepat lagi melalui Sinar-X pada 1912. Hukum Steno dikenali sebagai Sudut Antara Permukaan Tetap. Seterusnya Hauy(1743-1822) yang menyelidiki kristal melalui kaedah pembelahan mengusulkan Hukum Struktur Kristal sebagai "semua kristal selalunya terbentuk dan tersusun daripada unit-unit kecil yang berbentuk polihedra, dengan setiap unit pada mineral tertentu selalu mempunyai bentuk yang khas". Huay juga mengusulkan Hukum Pemotongan Asas sebagai "pemotongan kristal pada paksi-paksinya selalu menunjukkan perbandingan pembolehubah yang asas dan tetap". Manakala Bravais Lattice pada 1850 menyatakan bahawa "pola di dalam kristal mengikuti aturan susunan atom/ion dalam ruang kekisi". Di sini kami akan berusaha untuk membincangkan pembangunan ilmu matematik yang terlahir daripada aksiom-aksiom ini.

Paper is not available



Application of chemometrics in Environmental Chemistry for Sustainable Utilisation of Water Resources: Langat Basin as a Case Study

Mazlin B. Mokhtar¹, Hafizan Juahir¹, Sharifuddin M. Zain², Ijan Khushaida M. Jan¹, M. Ekhwan Toriman³, Baharuddin Abdullah⁴, Zaihan Jalaludin⁵

- 1) Institute for Environment and Development (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia
mazlin@pkisc.cc.ukm.my, hafizan71@hotmail.com, ijan@hotmail.com
- 2) Chemistry Department, Faculty of Science, Universiti Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia
smzain@pkisc.cc.ukm.my
- 3) School of Social, Development and Environment, FSKK, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia
iwan550@hotmail.com
- 4) National Hydraulic Research Institute of Malaysia (NAHRIM), Ministry of Natural Resource and Environment, Jalan Putra Permai, Sri Kembangan 43300 Selangor, Malaysia
baharuddin@nahrim.gov.my
- 5) Forest Research Institute Malaysia, 52109 Kepong, Kuala Lumpur, Malaysia
zaihan@frim.gov.my

Abstract

Malaysia have adopted the concept of sustainable development as mentioned in the National Documents of the 8th Malaysian Plan and OPP3. This calls for environmental studies within the context of sustainable science and governance. This study details the application of chemometrics in environmental chemistry for sustainable utilization of resources in the Langat Basin, Selangor, Malaysia. We hope to demonstrate in this work the importance of historical data, if they are available, in planning sampling strategies to achieve desired research objectives. This study was conducted in order to highlight the possibility of determining the optimum number of sampling stations which in turn would reduce cost and time of sampling. The seasonally dependent water quality data of Langat River was investigated during the period December 2001 – May 2002. Monthly samples were collected from four different plots. Concentrations of nitrate, sulfate, phosphate, lead, cadmium, iron, zinc, copper, suspended sediment (SS), ammoniacal nitrogen (AN), chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD) were determined. Dissolved oxygen, temperature, pH and conductivity were measured in situ. Chemometric treatments using cluster and principal component analysis were employed in which data were characterized as a function of season and sampling sites, thus, enabling significant discriminating factors to be discovered. Results showed that at chord distance 75.25 the cluster gave two groups of sampling plot. Group I consists of 6 sampling stations while Group II consists of 14 sampling stations (Figure 1,2 and 3). The two clusters are discussed in terms of the difference in data variability.

Keywords: chemometrics, principles component analysis, cluster analysis

1. Introduction

Environmental data is complex and depends on unpredictable factors that are usually characterized by their high variability. The

main origins of this variability are geogenic, hydrological, meteorological and also anthropogenic (such as different emitters and dischargers) (Einax *et al.*, 1998). Due to the

non-linear nature of environmental data, analyzing these data may be tricky. The multivariate nature of these data together with their complex interrelation requires that multivariate data analysis techniques be employed in order to decipher any structure within the data. In this study the application of chemometrics methods is used to determine the number of sampling sites which are significantly different to each other. This work is motivated by the fact that an understanding of the nature of sampling sites would help in reducing the number of redundant sites, thus reducing cost and time.

The data collected in this study came from 4 different sampling plots which gave 17 sampling sites altogether. The study was conducted by a postgraduate student to measure the impact of palm oil plantation activities to the water quality in the Langat River Basin. The selected plots are Kg. Bukit Dugang, Kg. Jenderam, Bukit Changgang and Labohan Dagang which are located along the river basin with palm oil activities. In this study, the sampling plots were selected based on the economic needs of two districts involved in this study area (Kuala Langat and Sepang District). The main economic activities for both districts are agriculture and industry with palm oil plantation as the main agricultural activity (Pihak Berkuasa Perancang Tempatan Kuala Langat, Sepang and Putrajaya, 2000). Unfortunately, the study was conducted without proper sampling design and the selected plots were not statistically identified. It is well known that much have been studied on water quality by many researchers for the Langat River Basin. Therefore, secondary data from previous research can be used to obtain much information to help us in designing new research at the Langat River Basin. The abundance of secondary data motivated us to use chemometric methods in order that proper sampling design can be obtained.

Massart *et al.*, (1997) defined "chemometrics as a chemical discipline that uses mathematics, statistics, and formal logic (a) to design or select optimal experimental procedures; (b) to provide maximum relevant chemical data; and (c) to obtain knowledge about chemical systems". Chemometric methods have been used for the classification and comparison of

different samples (Massart *et al.*, 1997). Some examples of the use of chemometrics are as a multicriteria decision-making (Khalil *et al.*, 2004), chemometric investigation of variable and site correlations (Abollino *et al.*, 2001), determination of correlation of chemical and sensory data in drinking waters by factors analysis (Meng *et al.*, 1997). The chemometric applications in evaluating environmental data has been demonstrated in several publications (Mendiguchia *et al.*, 2004; Brodnjak-Voncina *et al.*, 2002; Marengo *et al.*, 1995).

This study was carried out to fulfill these objectives, (i) to apply chemometrics in recognizing patterns in the sampling data (ii) to evaluate and interpret river pollution data (iii) to encourage the use of secondary data to help scientists and researchers in designing better approaches to future studies and (iv) to understand how computer and software technologies can assist scientists and engineers in their studies. In this preliminary study, we look at (i) in specific.

2. Experimental Study site

Langat River Basin is formed by three main river which are Langat River, Semenyih River and Labu River. At the length of about 125.6 km, the rivers flow across Negeri Sembilan and Selangor State. Langat River is one of the most important raw water resources for drinking water and other activities such as recreation, industrial uses, fishery and agriculture. In this area, agriculture is the main activity which covers 53.1% of the area, while 3.6% are for commercial purposes. Palm oil plantation takes 20,993 ha from the area and another 13,574 ha is covered by rubber plantation.

Up to 17 sampling sites were selected to cover the study (see Fig. 1). To select the location of the sampling stations the conventional method based on economic activities are taken into consideration. The sampling stations are divided into four plots which are plots one and two namely Kampung Bukit Dugang and Kampung Jenderam consisting of five sampling station located in the Sepang District. Plots 3 and 4, namely Bukit Changgang and Labohan Dagang are located in Kuala Langat District which consists of four and three sampling stations respectively (see Table 1.).

Table 1.: Plot and sampling station location

District	Study area (plot no.)	Station no.	Coordinate		Area description
			Latitude	Longitude	
Sepang	Kampung Bukit Dugang (Plot 1)	1.1	101°43.387'	02°53.778'	<ul style="list-style-type: none"> Surrounding by palm oil plantation Aborigine village Sand mining (st. 1.4 & 1.5)
		1.2	101°43.282'	02°53.904'	
		1.3	101°43.262'	02°53.818'	
		1.4	101°43.088'	02°53.760'	
		1.5	101°42.925'	02°53.633'	
	Kampung Jenderam (Plot 2)	2.1	101°43.853'	02°52.036'	<ul style="list-style-type: none"> Surrounding by palm oil plantation Village
		2.2	101°43.523'	02°52.177'	
		2.3	101°43.208'	02°52.430'	
		2.4	101°42.795'	02°52.841'	
		2.5	101°42.571'	02°53.013'	
Kuala Langat	Bukit Changgang (Plot 3)	3.1	101°39.079'	02°49.156'	<ul style="list-style-type: none"> Surrounding by palm oil plantation Village
		3.2	101°38.590'	02°48.806'	
		3.3	101°38.564'	02°48.823'	
	Labohan Dagang (Plot 4)	3.4	101°38.500'	02°48.787'	<ul style="list-style-type: none"> Surrounding by palm oil plantation Village Wetland (st. 4.3)
		4.1	101°36.990'	02°47.510'	
		4.2	101°36.964'	02°47.520'	
		4.3	101°36.853'	02°47.454'	

Table 2: Sampling plots showing samples taken at different seasons

Plot	Station	Sampling date					
		a	b	c	d	e	f
<i>I</i>	1.1	cloudy	cloudy	dry	overcast	overcast	overcast
	1.2	cloudy	dry	dry	overcast	overcast	clear
	1.3	cloudy	dry	dry	overcast	overcast	clear
	1.4	overcast	dry	dry	overcast	overcast	clear
	1.5	overcast	dry	dry	overcast	overcast	clear
<i>II</i>	2.1	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	2.2	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	2.3	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	2.4	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	2.5	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
<i>III</i>	3.1	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	3.2	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	3.3	overcast	dry	dry	overcast	overcast	dry
	3.4	overcast	dry	dry	overcast	clear	dry
<i>IV</i>	4.1	overcast	dry	dry	overcast	clear	dry
	4.2	overcast	dry	dry	overcast	clear	dry
	4.3	overcast	dry	dry	overcast	clear	dry

Note: (a) 26 December 2001, (b) 10 January 2002, (c) 19 February 2002, (d) 3 March 2002, (e) 13 April 2002 and (f) 15 May 2002

Sampling

A total of 102 water samples were collected from each plot consisting of 17 sampling stations during the site visit, in December 2001 up to May 2002. The sampling dates were divided into two weather conditions; three sampling days in dry weather season (10th

January 2002, 19th February 2002 and 15th May 2002) and another three days in the rainy season (26th December 2001, 3rd March 2002 and 13th April 2002). Table 2 indicates the station sampled in each site visit. 16 physico-chemical parameter were determined; water temperature (°C), pH, SS, DO, BOD, COD,

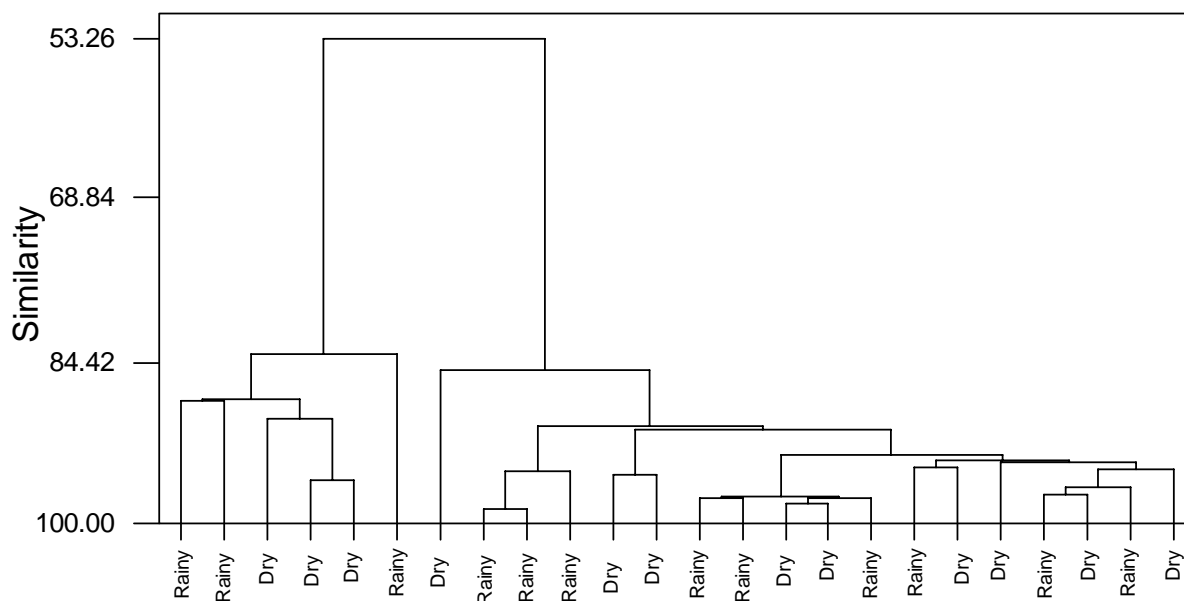


Fig. 1: Seasonal dendrogram calculated by the Ward method for the variables of Table 2. The four sampling plots with six sampling periods

AN, conductivity, nitrate, sulfate, phosphate, lead, cadmium, iron, zinc, and copper (Table 3).

Analytical procedures

Dissolved oxygen, temperature, pH and conductivity were measured in situ. AN, phosphate, nitrate, sulfate were determined using HACH KIT (192) 8038 Spectrophotometer HACH DR 2000. Heavy metals (Pb, Fe, Zn, Cu and Mn), BOD and SS, were analyzed according to APHA (1998). While COD was determined using HACH KIT (1992) 8000, Thermoreactor Model-Eco 16 Thermoreactor Velp Scientifica.

Statistical procedures

In principal components analysis (PCA), eigenanalysis of the experimental data was performed to extract principal components (PCs) of the measured data, using two selection criteria: the scree plot test and corrected average eigenvalue. For hierarchical cluster analysis (CA), the squared Euclidean distance between normalized data was used to measure similarity between samples. Both average

linkage between groups and Ward's method were applied to raw data and the results obtained were represented in a dendrogram.

Statistical analysis were carried out by using both Datalab for Teach/Me software (Lohninger, 1999) and Minitab for Windows 13.0 software packages.

3. Result and discussion

Table 3 reports all the data obtained for the samples collected. The data set consists of 24 samples which comes from 4 different plots which consists of 17 sampling sites. Plot one and two consists of 5 sampling sites each. Plot three consist of 4 sampling sites and plot four consists of 3 sampling sites. The samples were collected in 6 different sampling periods. For each of the 24 samples 16 features have been evaluated.

Cluster Analysis

Cluster analysis is one of the method are applied in unsupervised pattern recognition (Brereton, 2002; Forina *et al.*, 2002; Einax *et al.*, 1998). In this study cluster analysis was applied to search for clusters due to different

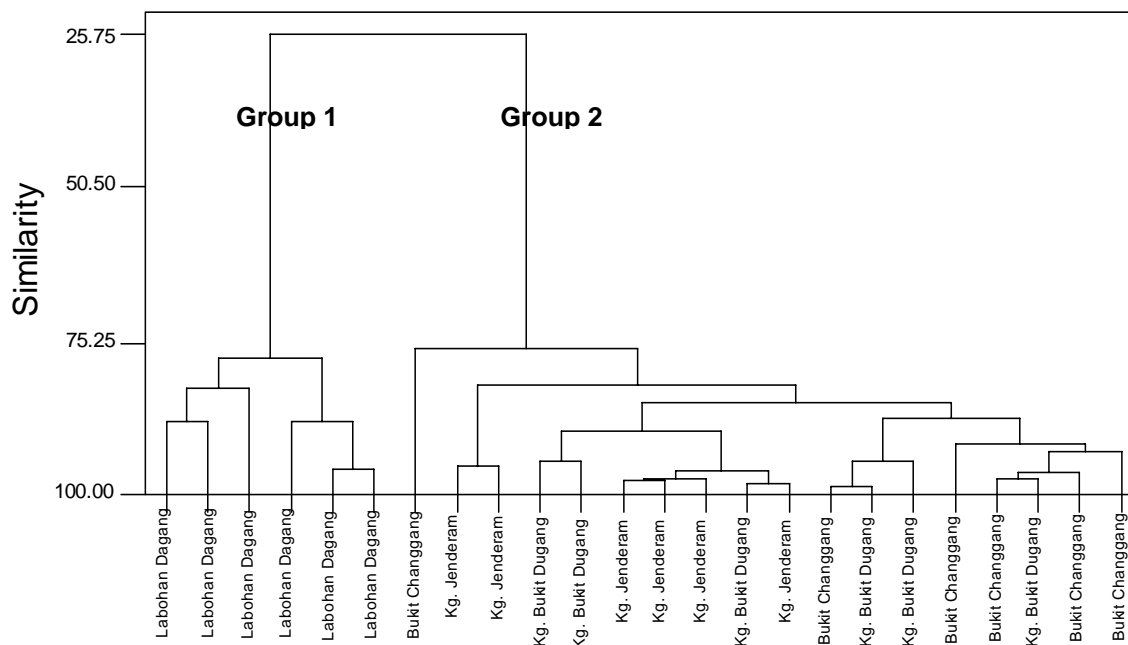


Figure 2: Sampling plot dendrogram clearly separating Labohan Dagang and the other plot

sampling period or different sampling sites by using water quality variables or features. The agglomerative hierarchical cluster analysis according to Ward was applied to detect multivariate similarities between sampling sites in different sampling plots for different sampling periods. From Figure 1 it is observed that separation between group 1 and group 2 is clearly not due to seasonal changes. Differences in the feature values (water quality parameters) due to seasonal changes are distributed over the whole area of sampling plots. It does not form the basis of the separation observed in the objects (sampling sites).

On the other hand, Figure 2 shows that if the separation is grouped according to sampling plots, the separation shows clear discrimination of Labohan Dagang and the other sites. It can be seen that Labohan Dagang (Group 1) sampling plot at similarity level 0.7525 is very different from the others. In this study the other three sampling plots which merge at similarity level 0.7525 (Bukit Changgang, Kampung Jenderam and Kampung Bukit Dugang) forms a single group (Group 2).

The two groups of samples from plots 4 (Group 1) and plots 1, 2 and 3 (Group 2) join at a lower level of similarity in the sampling plot dendrogram (Figure 2) compared to the seasonal dendrogram (Figure 1). This demonstrates that, from a hierarchical point of view, the difference between the two separated groups (1 and 2) is larger in the sampling plot dendrogram (Figure 2) compared to the seasonal dendrogram (Figure 1). This is an indication that separation of sampling plot should be used as a more significant factor in forming the basis of choosing sampling sites in order to study the effects of palm oil plantation on water quality. Searching for seasonal dependencies based on the conventionally chosen sampling sites is consequently an ineffective exercise which involves high cost and much time being wasted.

Principal Component Analysis

Table 4 shows the variance explained by the principal components obtained in a principal component analysis (PCA). It clearly shows that most of the data variance is explained in the first 2 PCs (99.46%). This result is in agreement with the observed highly redundant

Table 4.: Variances of PCA for the first six PCs

PC	Variance (%)	Total
1	92.70	92.70
2	6.76	99.46
3	0.26	99.72
4	0.17	99.88
5	0.07	99.96
6	0.04	99.99

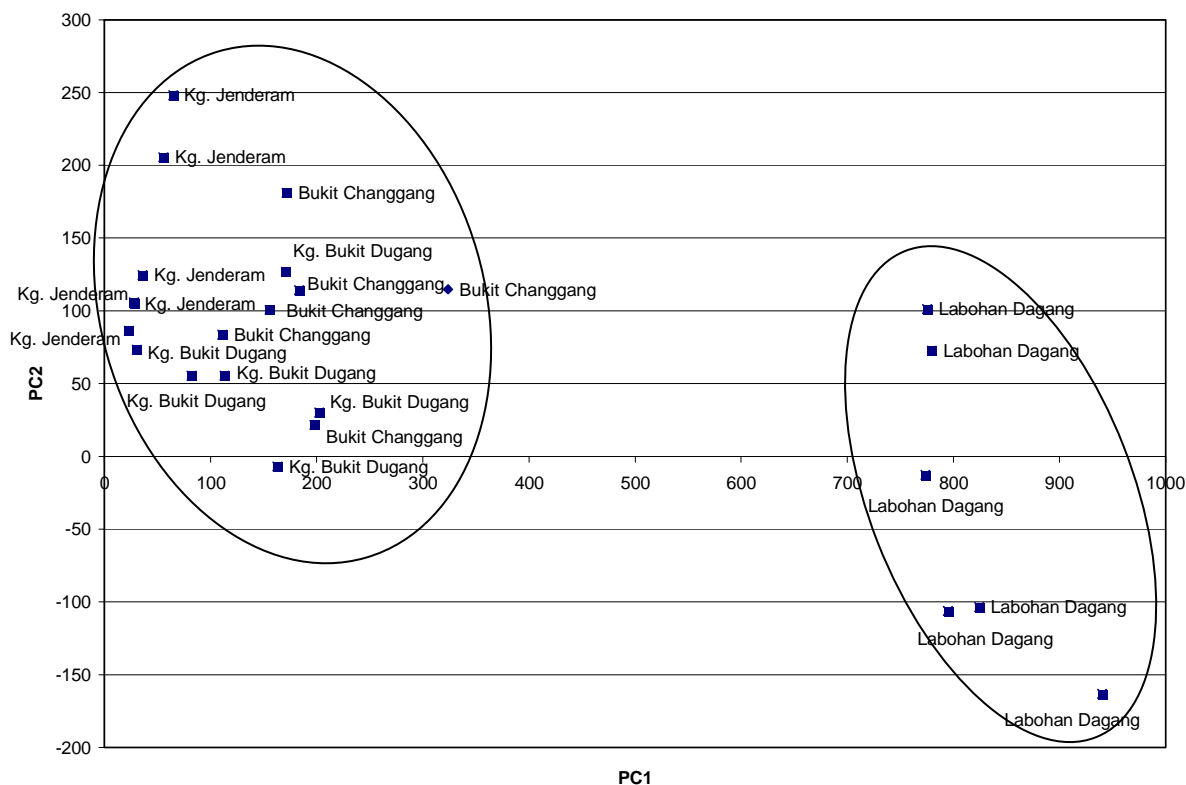


Fig. 3: Principal component analysis for four sampling plots (with six sampling periods)

information caused by the presence of several variables with high covariance.

Figure 3 shows the scores of the objects (sampling sites) in a space spanned by PC1 and PC2. The loadings of each feature (water quality variables) are shown for PC1 in Figure 4. In Figure 3, the scores plot clearly shows two linearly separable clusters. The cluster on the right is formed by sampling sites in the Labohan Dagang plot while the rest of the sampling stations in the 3 sampling plots (Kampung Bukit Dugang, Kampung Jenderam and Bukit Changgang) form the other cluster. This further confirms, via visual inspection, the dendrograms obtained from the hierarchical

analysis results. It can be remarked from the values of the loadings of the features for PC1 (92.70%) (Figure 4) that the difference between the two groups of sampling plots (Group 1 and 2) is mainly due to the suspended solid (SS) (variable 4). Suspended solid is related to the natural erosion from the forest and agriculture area (Wan Mohd Muhiyuddin Wan Ibrahim et al., 2000). The second important variable is the conductivity (variable 3) which is due to high concentration of inorganic compounds in the water sample (APHA, 1998). This observation would form the second part of our study – relating the SS and conductivity difference in Labohan Dagang to palm oil plantation, if there

any, or relating them to other, as yet, unknown activities near the sampling sites in the said plot.

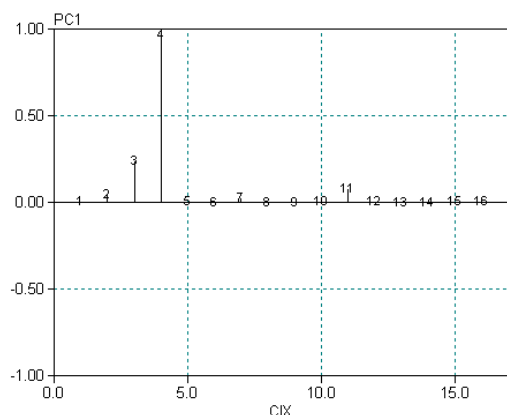


Fig. 4: Plot of PC1 loadings

4. Conclusions

In conclusion, this study have demonstrated that simple chemometric treatments are able to draw out from raw data, information that would enable us to more effectively determine the right sampling site for a particular objective, in order to reduce cost and time. In the case of the data obtained in the study, in order to determine the effects of palm oil plantation to water quality, the researcher should have determined the sampling sites in a more effective manner; relating the objective of the study to the types of sites to be chosen for sampling purposes.

In this study, seasonal variation was found not to be the main separation factor. Thus, the initial sampling strategy used in order to study the effects of palm oil plantation as well as looking for seasonal changes at different sampling sites proves to be ineffective. The sampling sites chosen in plots 1, 2 and 3 prove to be redundant in this study and should be reassessed to give a more optimum number of sampling stations. The separation of sampling plots due to suspended solids and conductivity, if these were historically available for the studied area, should have been the significant factors to be taken into consideration in designing the initial sampling strategy. The abundance of historical data should be taken advantage of in designing these new sampling strategies. Use of chemometric methods, for example, should be encouraged in the analysis of the data that would bring about new information which will prove to be useful in reducing cost and time of sampling. The

application of cluster analysis, followed by principal component analysis as a classification method, as demonstrated in this study, helps to separate differently polluted rivers sections and would help tremendously in future river pollution monitoring projects.

5. Acknowledgement

The Institute of Environment and Development (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia and Chemistry Department, Faculty of Science, University Malaya.

6. References

- Abollina, O., Aceto, M., Gioia, C. L., Sarzanini, C. and Mentasti, E., 2001. Spatial and seasonal variations of major, minor and trace elements in Antarctic seawater. Chemometric investigation of variable and site correlations. *Advances in Environmental Research* 6, 29-43
- APHA, 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th. Ed. Washington: American Public Health Association, AWWA, MPCF
- Brereton R.G., 2002. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Son Ltd., West Sussex, England.
- Brodnjak-Voncina, D., Dobcnik, D., Novic, M. and Zupan, J., 2002. Chemometrics characterization of the quality of river water. *Analytica Chimica Acta* 462, 87-100
- Einax, J. W., Truckenbrodt, D., and Kampe, O., 1998. River Pollution Data Interpreted by Means of Chemometric Methods. *Microchemical Journal* 58, 315-324
- Forina M., Armanino C. and Raggio V., 2002. Clustering with dendograms on interpretation variables. *Analytica Chimica Acta* 454, 13-19
- Khalil, W.A., Goonetillke, A., Kokot, S. and Carrol, S., 2003. Use of chemometrics methods and multicriteria decision-making for site selection for sustainable on-site sewage effluent disposal. *Analytica Chimica Acta* 506, 41-56
- Lohninger H., 1999. *Teach/Me, SDL-Software Development Lohninger Teach/Me DataLab 2.002*, Springer, Berlin
- Marengo, E., Gennaro, M.C., Giacosa, D., Abrigo, C., Saini, G. and Avignone, M.T., 1995. How chemometrics can helpfully assist in evaluating environmental data Lagoon water. *Analytica Chimica Acta* 317, 53-63
- Massart, D.I., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Long, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke,

J., 1997. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam

Mendiguchia, C., Moreno, C., Galindo-Riano, D.M. and Garcia-Vargas, M. 2004. Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river water. A case study: Guadalquivir River (Spain). *Analytica Chimica Acta* 515, 143-149

Meng, A.K. and Suffet, I.H., 1997. *Environ. Sci. Technol.* 31, 337-345

Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Michotte Y. and Kaufman L., 1988. *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam.

Pihak Berkuasa Perancang Tempatan Kuala Lang at, Sepang dan Putrajaya, 2000. *Laporan pemeriksaan rancangan struktur Kuala Lang at, Sepang dan Putrajaya*. Selangor: Jabatan Perancang Bandar dan Desa Semenanjung Malaysia Cawangan Tengah dan Jabatan Bandar dan Desa Negeri Selangor.

Wan Mohd Muhiyuddin Wan Ibrahim, Ibrahim Komoo and Pereira J.J., 2000. Hubungan di antara degradasi fizikal dan perubahan litupan tanah di Lembangan Lang at. Dlm. Mohd Nordin Hasan (pynt.). *Proceeding of the 1999 Lang at Basin Research Symposium*, Bangi: LESTARI, 126-13

Table 3: Experimental data

Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Sampling site	pH	Temp.	Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	SS (mg/L)	DO (mg/L)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	AN (mg/L)	PO (mg/L)	NO (mg/L)	SO (mg/L)	Pb (mg/L)	Cd (mg/L)	Fe (mg/L)	Zn (mg/L)	Cu (mg/L)
Kg. Bukit Dugang (26/12/2001)	5.8	30.0	69	65.4	3.0	5.44	21	1.57	0.16	3.1	0.8	0.54	0.01	2.8	0.04	32.56
Kg. Jenderam (26/12/2001)	3.5	27.0	126	2.8	1.5	3.74	18	1.57	0.14	0.9	6.6	0.26	0.01	2.2	0.08	2.01
Bukit Changgang (26/12/2001)	5.9	28.0	67	186.3	4.7	6.20	9	1.32	0.08	1.3	0.6	0.37	0.01	0.09	0.02	2.46
Labohan Dagang (26/12/2001)	5.8	29.0	96	815.3	3.6	5.44	45	0.57	0.04	6.3	138.9	0.55	0.02	2.2	0.08	2
Kg. Bukit Dugang (10/01/2002)	5.8	32.0	74	10.6	4.3	2.00	9	1.60	1.50	2.6	3.0	1.65	0.15	2.44	2.28	2.92
Kg. Jenderam (10/01/2002)	5.2	24.5	211	1.6	1.2	0.45	6	2.41	0.85	0.8	15.9	3.42	0.44	1.46	2.04	2.41
Bukit Changgang (10/01/2002)	5.3	29.6	189	283.7	4.2	1.32	24	1.34	0.11	2.8	20.6	2.73	0.14	3.8	2.24	3.31
Labohan Dagang (10/01/2002)	5.6	30.0	175	746.9	1.7	0.68	10	0.87	0.03	5.7	102.6	1.11	0.16	0.38	1.67	2.05
Kg. Bukit Dugang (19/02/2002)	5.5	31.0	76	95.4	4.2	2.51	8	1.24	1.94	1.4	2.0	3.85	0.25	2.59	2.19	71.95
Kg. Jenderam (19/02/2002)	6.3	28.1	255	0.1	0.3	0.10	1	2.22	0.96	0.7	13.0	4.28	0.45	1.61	1.88	2.38
Bukit Changgang (19/02/2002)	5.4	32.9	215	119.9	5.0	1.17	2	1.71	0.12	3.9	25.0	2.57	0.13	5.87	1.96	1.44
Labohan Dagang (19/02/2002)	5.5	30.5	290	724.3	0.6	0.01	27	1.44	0.01	3.9	44.0	1.79	0.13	0.62	2.23	1.62
Kg. Bukit Dugang (3/03/2002)	5.7	30.5	29	158.9	4.2	1.28	7	0.60	0.01	0.9	7.0	8.27	0.67	1.92	3.96	0.49
Kg. Jenderam (3/03/2002)	4.7	28.2	105	0.1	1.2	1.63	25	1.95	0.04	0.8	7.0	6.85	0.36	0.81	3.6	0.19
Bukit Changgang (3/03/2002)	4.2	29.2	153	147.6	1.1	1.14	0	1.84	0.01	1.4	27.0	3.57	0.69	3.47	3.42	0.26
Labohan Dagang (3/03/2002)	5.1	29.1	74	951.4	3.4	0.29	10	2.04	0.01	1.1	31.0	2.84	0.18	0.16	5.89	0.12
Kg. Bukit Dugang (13/04/2002)	5.8	29.4	76	188.1	2.3	0.50	8	0.50	0.14	1.1	5.0	4.45	0.39	1.27	3.41	0.12
Kg. Jenderam (13/04/2002)	5.2	29.6	106	0.2	2.1	0.43	1	1.89	0.26	1	1.0	2.58	0.18	1.18	6.87	0.13
Bukit Changgang (13/04/2002)	5.9	29.8	132	123.5	3.6	0.99	2	1.89	0.01	1.5	32.0	2.39	0.43	3.21	3.14	0.03
Labohan Dagang (13/04/2002)	5.1	29.9	92	795.7	4.0	0.67	26	1.99	0.01	1.2	29.0	3.81	0.1	0.14	7.21	0.18
Kg. Bukit Dugang (15/05/2002)	6.6	27.8	163	133.5	6.1	1.74	2	1.84	0.38	1.2	9.0	1.09	0.09	2.27	4.54	0.16
Kg. Jenderam (15/05/2002)	6.7	31.2	85	0.3	4.6	0.35	4	0.23	0.25	0.8	5.0	6.74	0.16	1.09	3.4	0.28
Bukit Changgang (15/05/2002)	6.3	32.4	104	85.3	5.1	1.21	1	1.23	0.00	1.2	18.0	5.54	0.6	3.49	4.39	0.22
Labohan Dagang (15/05/2002)	4.6	30.3	263	734.7	4.7	0.43	7	2.41	0.02	1.5	63.0	3.79	0.01	0.15	1.79	0.43

Polynuclear Molybdenum Complexes: Synthesis, Electrochemical And Spectroelectrochemical Studies

Mohammad B. Kassim¹, Jon A. McCleverty² and Michael D. Ward³

¹Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, FST, UKM

²School of Chemistry, University of Bristol, UK

³University of Sheffield, Sheffield, U.K.

Abstract

The synthesis of molybdenum complexes containing Tp^* {tris(3,5-dimethylpyrazolyl)borate} and nitrosyl co-ligands is described. The trinuclear complex with 1,3,5-trihydroxybenzene ligand, a new analogue of the polynuclear molybdenum nitrosyl with arenediolate complexes, has not been reported previously. The new trinuclear analogue exhibited interesting coordination behaviour in comparison to the dinuclear complexes containing $\{Mo(NO)Tp^*Cl\}$ moiety behaviour. The electrochemistry of the dinuclear and trinuclear complexes showed 2 and 3 reduction waves, respectively. At least one oxidation wave was detected for all complexes which have not been reported previously. The redox behaviour of these complexes, including the new trinuclear $[\{Mo(NO)Tp^*Cl\}_3(1,3,5-O_3C_6H_3)]$ complex, were affected by the length and substitution pattern of the bridging ligands. The electronic properties of the complexes were studied by UV/Vis and IR spectroelectrochemistry. The mixed-valence states of the trinuclear complex behave as a Class II system according to the Robin and Days classification and there was no evidence of inter-valence charge transfer band (IVCT) in the mixed-valence state of the trinuclear $[\{Mo(NO)Tp^*Cl\}_3(1,3,5-O_3C_6H_3)]$ complex. The IR spectroelectrochemical study showed that addition of one electron into the metal centre caused the stretching frequency of the NO ligand to move about 100 cm^{-1} to a lower frequency. The electronic properties of these molecules showed the effect of the bridging ligand on the electron transfer process in polynuclear complexes. The evaluation the bridging ligand ability of to facilitate electron transfer between metal centres is of great interest in the field of optical switch and molecular wire.

1. Introduction

We have been interested in the study of redox-active metal complexes that have a strong absorbance in the near-infrared (Nir) region of the electromagnetic spectrum.^{vi} Our recent work in this area involved the detailed study of metal complexes containing $\{MoTp^*(NO)Cl\}$ [Tp^* = tris(3,5-dimethylpyrazolyl)borate] fragment at either end of a phenolate/arenediolate bridging ligand. Such compounds are examples of electrochromic NIR dyes,^{vii} which are of potential technological relevance in the areas of optical data storage and transmission, both of which rely on readily available semiconductor diode lasers which operate in the Nir region of the spectrum. We present in this paper the study of

the mixed-valence species of polynuclear molybdenum phenolate/arenediolate complexes.

2. Experimental

Material and method

Complex $[Mo(NO)Tp^*Cl_2]$ was prepared according to published method.^{viii} Bridging ligands *m*-dihydroxybenzene, *p*-dihydroxybenzene, 4,4'-dihydroxybiphenyl, 1,3,5-trihydroxybenzene were purchased from Aldrich and used as received. Instrumentation and methods used for electrochemistry and UV/Vis/NIR spectroelectrochemistry (specchem) studies has been described before.^{ix}

Syntheses

Syntheses of all complexes (Figure 1):

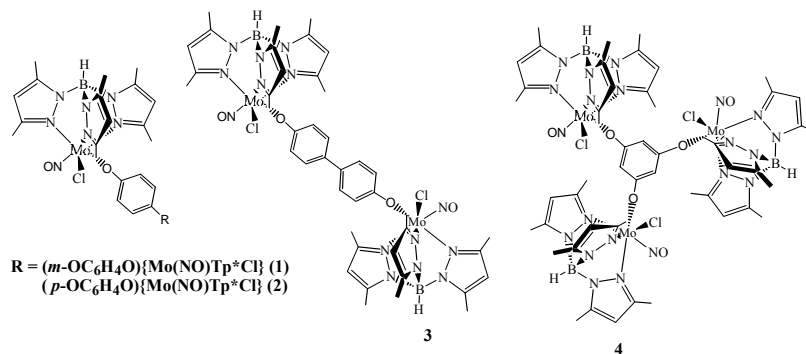


Figure 1. Structural formula of the complexes showing the numbering system.

$\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}_2(m\text{-OC}_6\text{H}_4\text{O})$, **1**,
 $[\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}_2(p\text{-OC}_6\text{H}_4\text{O})]$, **2**, and
 $[\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}_2(4,4'\text{-OC}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{O})]$, **3**;
 follow the basic method described by
 McCleverty and co-worker for the preparation
 of **2**.^x The trinuclear complex
 $[\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}_3(1,3,5\text{-O}_3\text{C}_6\text{H}_3)]$, **4**
 was synthesized with a different method as
 described below. All reactions were carried out
 with dried solvents under N_2 .

Complex $[\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}_3(\text{O}_3\text{C}_6\text{H}_3)]$, **4**: A
 mixture of $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$ (0.50 g, 1.01
 mmol), 1,3,5-trihydroxybenzene (0.04 g, 0.32
 mmol) and triethylamine (2 cm^3 , excess) in dry
 toluene (50 cm^3) was stirred at room
 temperature for 1 h, and the reaction mixture
 then heated to reflux for 5 d. During this time
 the reaction mixture changed from brownish
 yellow to dark red. A tlc of the reaction
 mixture showed 5 main bands - a yellow band
 due to the starting material $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$,
 followed by two red bands (trinuclear and
 dinuclear products), a grey band, and a
 purplish-red band close to the baseline
 (probably a mononuclear product). The
 product mixture was purified by
 chromatography affording a trinuclear (0.34 g,
 23 %), a dinuclear (0.07g, 7%) and some
 mononuclear and other by products.

3. Result and Discussion

Syntheses and Characterization

All complexes were prepared by the reaction of
 $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$ with AgBF_4 in the present of
 the appropriate ligands. The reaction with
 AgBF_4 results in the removal of one chloro
 ligand. In the presence of phenolate ligands the
 desired complexes are formed in reasonable
 yield. The reaction using $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$
 and *p*-dihydroxybenzene in a 2:1 mol ratio,
 to form **2**, also resulted in significant amount of
 mononuclear complex $[\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}(p\text{-}$

$\text{OC}_6\text{H}_4\text{OH})]$ in which one of the phenolate unit
 is not coordinated. However, the reaction
 between $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$ with *m*-
 dihydroxybenzene requires 1:4 mol ratios and
 longer reaction time in order to produce a
 reasonable yield. This may be due to the bulky
 $\{\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}\}$ moiety which causes a
 greater steric hindrance for the formation of
 dinuclear complexes. The reaction of
 $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$ with 4,4'-dihydroxybiphenyl
 produced mainly the polynuclear product **3**.

The trinuclear species **4** was obtained under
 slightly different conditions, $[\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$
 was reacted with 1,3,5-trihydroxybenzene in
 toluene in the presence of triethylamine. The
 salt $[\text{Et}_3\text{NH}][\text{Mo}(\text{NO})\text{Tp}^*\text{Cl}_2]$ was thought to be
 one of the intermediates in this reaction
 although it was not detected.^{xi} The di- and
 trinuclear product mixtures were separated
 chromatographically from the rest of the
 product mixture, and then a second column on
 flash silica gel was employed to separate the
 trinuclear from the dinuclear species. It proved
 difficult to separate the trinuclear species, **4**,
 from the dinuclear species and this was
 reflected in the low yield of this reaction. The
 microcrystalline solid gave a dark-red coloured
 solution in dichloromethane.

Electrochemical Properties

All complexes were investigated by cyclic
 voltammetry in CH_2Cl_2 and exhibited the
 expected reduction process(es), Table 1. The
 dinuclear complexes exhibited two reversible
 reductive electrode processes; reduction of **1**, **2**
 and **3** to the monoanionic Mo(II)/Mo(I) mixed-
 valence state occurred at -0.90 V, -0.85 V and
 -0.93 V, respectively. Complex **2**, in which the
 metal centres are *para* to each other across the
 bridging *p*-benzenediolato ligand, is easier to
 reduce in comparison to **1** and **3**. The difference

Table 1. Formal potentials (V) for mononuclear, dinuclear and trinuclear complexes (vs. Fc^+/Fc^0 , scan rate 0.2 V s^{-1})^a

Complex	Reduction (E/V)			Oxidation (E/V)	
	E_1	E_2	E_3	E_1	E_2
1	0.90	1.16		1.05 ^b	~1.95 ^b
2	0.85	1.32		0.78	1.08 ^b
3	0.93	0.99		0.80	0.85
4	0.94	1.21	1.57	0.98 ^b	

^a Supporting electrolyte 0.1M $[(\text{NBu}_4)(\text{PF}_6)]$ in CH_2Cl_2 , ^b irreversible process

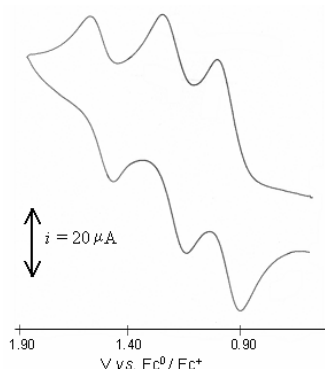

 Figure 2. Cyclic voltammogram of **4** shows three well separated reduction potentials.

 Table 2. UV/Vis absorption spectra of the nitrosyl molybdenum phenolate complexes recorded in CH_2Cl_2 .

Complexes	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm} (10^{-3} \text{ } \epsilon/\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1})$		
	λ_1	λ_2	λ_3
1	314 (14.6)	492 (11.0)	720 _{sh}
2	312 (13.5)	577 (17.1)	741 (6.0)
3	308 (19.2)	562 (17.1)	751 (3.8)
4	315 (16.7)	512 (15.7)	

sh = shoulder

(ΔE) between the first and the second reduction potential in the dinuclear species reflects the degree of interaction between the metal centres. For example, ΔE for **2** is 470 mV, significantly larger than that for **1**, which is 260 mV. This is expected since the *para* substituted ligand will be much more effective at mediating delocalisation of the added electron across the bridging ligand than the comparable *meta*-disubstituted ligand. The cv of **3** showed a single broad reduction wave which suggests that metal-metal interaction is reduced when the bridging ligand is longer.

The redox behaviour of the trinuclear complex, **4**, is similar to that of **1**; the three reductive electrode processes are believed to be successive one-electron reductions of the Mo(II) metal centres to Mo(I)/Mo(I)/Mo(I). The internuclear interaction between the metal centres in **4** is very similar to that of **1**; the

separation between the first and second, and the second and the third reduction potentials, ΔE , is 270 mV and 140 mV compared to 260 mV and 160 mV for **1**, respectively (Figure 2). The separation between the second and the third reduction processes is much larger at 360 mV, because the third electron experiences two unfavourable electrostatic interactions with the negative charges at the other two Mo centres. Based on electrostatic arguments, therefore, the separation between the second and the third reduction processes should be approximately double the separation between the first and the second process, which is nearly the case. These observations were very similar to the related oxo Mo(V) species $[\{\text{MoTp}^*(\text{O})\text{Cl}\}_3(1,3,5\text{-C}_6\text{H}_3\text{O}_3)]$.^{xii}

These electrochemical measurements show that, on reduction of these multinuclear species, the topology and length of the bridging ligand

influence metal-to-metal interaction across the phenolate bridging ligands. This conclusion has precedence and has been observed in a number of similar studies of nitrosyl and oxo molybdenum complexes.^{xiii}

UV/Vis Electronic Absorption Studies

The UV/Vis absorption spectra of the dinuclear and trinuclear complexes displayed two main electronic transitions. A lower energy absorption ranged from 465 nm ($\epsilon = 5900 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) to 532 nm ($\epsilon = 7400 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) and can plausibly be assigned as a ligand-to-metal charge-transfer (LMCT) transition, phenolate \rightarrow Mo. A higher energy transition occurring between 310 nm and 315 nm ($\epsilon = 6300 - 6900 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) could not be so easily assigned. A reasonable assignment, based on previous observations, is that it may be a $\text{Cl}(\pi) \rightarrow \text{Mo}(d\pi)$ ligand-to-metal charge-transfer (LMCT).^{xiv}

The electronic spectrums of the polynuclear complexes are similar to those of their mononuclear analogues.^{xv} However, the intensities of the higher energy and the LMCT transitions were higher compared to those of the mononuclear complexes and this maybe due to the presence of two or more chromophores in the complexes (Table 2).

Complex **1** exhibits a phenolate \rightarrow Mo LMCT transition is at 492 nm. One-electron reduction of **1**, giving $[\mathbf{1}]^-$, resulted in the loss of the LMCT transition and the intensity of the higher energy transition was also slightly reduced. This process, representing formally a reduction of Mo(II) to Mo(I), is likely to result in addition of the single electron to the empty d_{xy} orbital. Partial occupation of the d_{xy} orbital would reduce its energy causing the ability of the Mo centre to accept electronic charge-transfer to decrease.

Comparison with the spectra of **1**, $[\mathbf{1}]^-$, and $[\mathbf{1}]^{2-}$ is interesting as the effect of substitution on the bridging ligand becomes apparent. The *meta*-substitution pattern of the bridging ligand results in each donor atom of the bridging ligand behaving more like an electronically isolated metal centre than that of **2** where this transition is at 577 nm. On reduction of **1** to $[\mathbf{1}]^-$, the phenolate \rightarrow Mo LMCT at 492 nm ($\epsilon = 11000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) was reduced to about half of the initial intensity ($\epsilon = 5800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$

cm^{-1}) and was shifted to 487 nm. This is consistent with the presence of localized Mo(I) and Mo(II) centres. However, the low-energy IVCT band, which is a striking feature of the spectrum of $[\mathbf{2}]^-$, Figure 3, was completely absent suggesting the *meta* substitution pattern has attenuated the metal-metal electronic coupling. However, the 260 mV separation between the Mo(II)/Mo(I) couples detected in the cv of **1** does suggest that the electronic interaction between the metal centres is still significant.^{xvi} It is possible that this redox splitting is mainly due to a through-space Coulombic effect because the metal centres are relatively close to each other.¹³ That being so, there is likely to be little contribution to the stability of the mixed-valence state arising from delocalization across the bridging ligand thus accounting for the lack of an IVCT band in the monoanionic species. Further one-electron reduction to dianion, $[\mathbf{1}]^{2-}$, resulted in complete disappearance of the charge-transfer band. The observation of spectral changes, which appears to be a stepwise reduction of the total absorption spectra of the two metal centres considered separately, suggests that the mixed-valence species behaves as a class I system.

Comparison of the spectra of **4**, $[\mathbf{4}]^-$, $[\mathbf{4}]^{2-}$, and $[\mathbf{4}]^{3-}$ reveals further the effect of the substitution pattern on the bridging ligand. In the spectrum of **4** the LMCT transition is at 512 nm ($\epsilon = 15700 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) which is similar to the position of the LMCT transition in **1** for reasons similar to those described above. Upon reduction of the neutral species to the mixed-valence species $[\mathbf{4}]^-$, the phenolate \rightarrow Mo LMCT was reduced to about two thirds of its initial intensity ($\epsilon = 9800 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) and was shifted to 530 nm. This may be regarded formally as a species containing Mo(I)/Mo(II)/Mo(II). On second reduction to the dianionic species $[\mathbf{4}]^{2-}$ [Mo(I)/Mo(I)/Mo(II)] the LMCT transition was reduced to about a third of its original intensity ($\epsilon = 6100 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$) and was shifted to 551 nm (Figure 4). The 270 mV and 360 mV separations between the redox couples for the three successive one-electron reductions to the Mo(I)/Mo(II)/Mo(II), Mo(I)/Mo(I)/Mo(II) and Mo(I)/Mo(I)/Mo(I) states of **4** respectively, indicate that the electronic interaction between the metal centres is significant. Thus, the

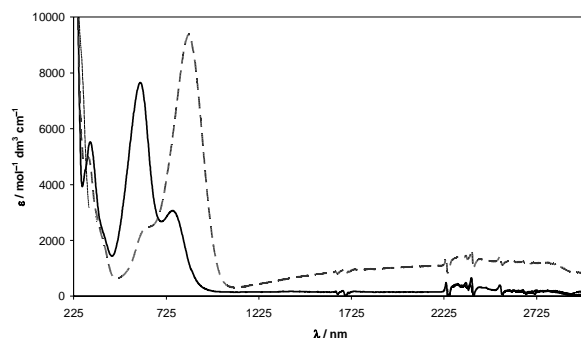


Figure 3. The spectral changes for successive one-electron reduction **2** (—) to $[2]^{-1}$ (---) and $[2]^{-2}$ (- · - ·), respectively.

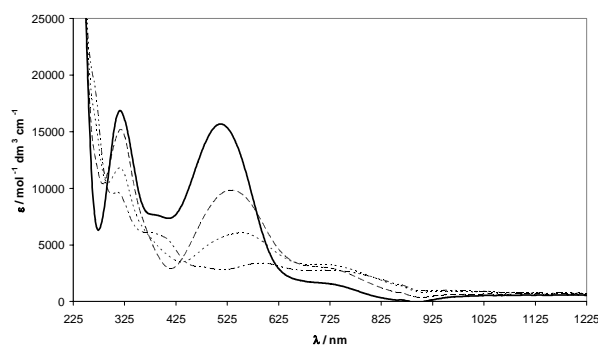


Figure 4. UV/Vis/Nir spectra of **4** (—) for three successive one-electron reduction to $[4]^{-1}$ (---), $[4]^{-2}$ (- · - ·) and $[4]^{-3}$ (- · · - ·).

Table 3. Changes in $\nu(\text{NO})$ upon accessible oxidation and reduction of the mononuclear and polynuclear complexes.

Compounds	$\nu(\text{NO}) \text{ cm}^{-1}$ in CH_2Cl_2	Position of the new $\nu(\text{NO}) / (\Delta \text{ cm}^{-1})$				
		1 st Red.	2 nd Red.	3 rd Red.	1 st Oxd.	2 nd Oxd.
1	1686	1579 (107) (1679) ^a	1571 (108)	-	1721 (35) 1688 ^c	1721 (33)
2	1676	1575 (101)	1547(129)	-	1713 (37)	1742 (29)
4	1686	1572 (114) (1682) ^a	1568 (114) (1675) ^b	1562 (113)	-	-

^a position of unreduced $\nu(\text{NO})$ after the first reduction process

^b position of unreduced $\nu(\text{NO})$ after the second reduction process

^c position of unreduced $\nu(\text{NO})$ after the first oxidation process

mixed-valence states appears to show class I behaviour.

Infrared-Spec-chem

The presence of the NO group in all of the complexes studied provides a spectroscopic “handle” for infrared spec-chem. Changing the electron density either on the metal centre or on the phenolate ligands will have an effect on the vibrational frequency of the NO group due to back-donation from the Mo *d*-orbital to the π^* -orbital of the NO group. The results of ir spec-chem are collected in Table 3.

Reduction

One-electron reduction of **1** produces the mixed-valence complex, $[1]^-$, with a formal Mo(II)/Mo(I), 16/17 valence electron configuration. The ir spectrum of the mixed-valence monoanion showed two ν_{NO} band at 1679 cm^{-1} and 1579 cm^{-1} . The resulting $[1]^-$ species, is asymmetric, with two NO stretching frequencies. It manifestly is not a delocalized system on the ir-timescale and the added electron is localized on one of the metal centres. One-electron addition to the complex

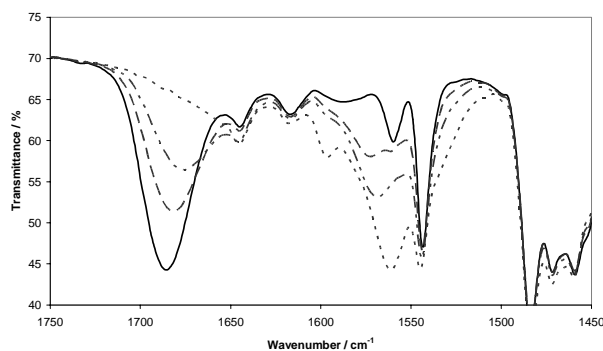


Figure 5. Infra-red spectra of **4** (—) for three successive one-electron reduction to $[4]^{-1}$ (---), $[4]^{2-}$ (- · - ·) and $[4]^{3-}$ (· · ·).



Figure 6. Infra-red spectra of **2** (—) showing the change in $\nu(\text{NO})$ after one-electron oxidation to $[2]^{+1}$ (---).

produces a 107 cm^{-1} shift in ν_{NO} of the Mo centre involved. There was a small shift in ν_{NO} of the unreduced centre, which could be due to the negative charge on the whole complex. This is consistent with the previous UV/Vis spec-chem experiment. The overall intensity of the new NO absorptions appears quantitatively to be half that the initial neutral species.

Further one-electron reduction of $[1]^{-}$ afforded the fully reduced species $[1]^{2-}$ and resulted in the disappearance of the NO stretching frequencies at 1679 cm^{-1} and 1579 cm^{-1} and replaced by a new absorption at 1571 cm^{-1} . These changes were expected since further reduction would produce two Mo centres in similar environments unless $[1]^{2-}$ underwent a rearrangement and produced a new species with different structural symmetry. A shift of 108 cm^{-1} is also consistent with the earlier changes recorded for the one-electron reduction of the neutral species.

The single NO stretching frequency in **2** disappeared completely upon generation of the

mixed-valence $[2]^{-}$ and a new ν_{NO} appeared at 1575 cm^{-1} , 101 cm^{-1} lower than that in the neutral species. Three other bands also appeared, at 1644 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} and 1556 cm^{-1} . The nature and origin of the band at 1556 cm^{-1} , by similar reasoning to the mononuclear complexes, is probably due to ν_{CC} of phenolate ring. The observation of only one NO stretching frequency strongly suggests that the added electron was significantly delocalized across the bridging ligand. This is no surprise since the UV/Vis/Nir spec-chem studies of the monoanion revealed a very broad absorption band spanning right across the Nir region, which is a characteristic of an IVCT band. The ir spec-chem results, therefore, indicate that mixed-valence $[2]^{-}$ behaves as a class II system.

Sequential reduction of **4** exhibited spectral changes very similar to that of **1**. Comparison with the positions and magnitudes of the changes during the reduction of **4** with earlier observations made with **1** suggested that the additional electrons in $[4]^{-}$, $[4]^{2-}$ and $[4]^{3-}$ were localized on the metal centres. This can be

seen from the appearance of two bands in the mono and dianion, where the relative intensities of the NO absorptions are approximately 1:2 and 2:1, respectively (Figure 5). The shifts of *ca.* 114 cm⁻¹ indicate addition of an electron to a specific Mo centre, and the substantially smaller shifts of the other NO absorptions are due to the increasing negative charge on the complexes. The mono- and dianionic species were chemically stable and the redox process was reversible, as discussed earlier. However, the trianionic species decomposed slowly on the timescale of the ir spec-echem experiment.

Oxidation

One-electron oxidation of **1** resulted in the original ν_{NO} at 1686 cm⁻¹ reducing in intensity by half and a new NO band appearing at 1721 cm⁻¹. Oxidation of the ligand, in this case, cannot result in formation of a semiquinone radical cation. As mentioned before, removal of an electron could occur from an orbital which is a substantial mixture of ligand, π^* -NO and metal orbitals, or from an O atom of the bridging group. What is clear, however, is that the resulting oxidized species is asymmetric, with two NO stretching frequencies. It manifestly is not a delocalized system on the ir timescale.

The oxidation of **2** also displayed spectral changes consistent with oxidation of the bridging phenolate ligand. The first oxidation process resulted in complete disappearance of ν_{NO} at 1676 cm⁻¹ and its replacement by a new absorption at 1713 cm⁻¹ ($\Delta = 37$ cm⁻¹). The oxidation product exhibited only one ν_{NO} , which indicates that both nitrosyl groups exist in the same environment, *i.e.* that the oxidized complex retains high symmetry (Figure 6). There are two possible explanations for this observation: first, the oxidation process resulted in loss of an electron from the bridging phenolate ligand orbital thereby generating a semiquinone radical anion; second, that the unique electron in the oxidized species was delocalized across the bridging ligand, equivalent to class III mixed-valence behaviour. However, the earlier observations of UV/Vis/Nir and ir spec-echem behaviour on the oxidation of mononuclear complexes strongly suggested the former explanation.

Further oxidation of [2]⁺ to [2]²⁺ resulted in ν_{NO} increasing by *ca.* 30 cm⁻¹. A broad infrared

band grew which appeared to consist of two very closely spaced bands and could not be resolved by the 4 cm⁻¹ resolution used in the study. The cv of the second oxidation process shows that the process is irreversible. It is possible that the dicationic species underwent rearrangement with loss of symmetry before slow decomposition occurred. This could account for the appearance of two closely spaced NO bands.

4. Conclusion

The mixed-valence states of **2** and **3**, most likely, exhibited class II behaviour whereas that of **1** and **4** are class I consistent with the electrochemical, UV/Vis/Nir and ir spec-echem observations.

5. Acknowledgement

The author wish to thank UKM/World Bank for M.B.K's study leave at the University of Bristol, UK.

6. References

- ^I (a) M. B. Kassim, R. L. Paul, J. C. Jeffery, J. A. McCleverty and M. D. Ward, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, 327, 160; (b) M. D. Ward, *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 24, 121; (c) W. Kaim, A. Klien, M. Glockle, *Acc. Chem. Res.*, 2000, 33, 755; (d) F. Paul, C. Lapinte, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, 431
- ^{II} A. McDonagh, S.R. Bayly, D. J. Riley, M.D. Ward, J.A. McCleverty, M.A. Cowin, C.N. Varanzza, R.V. Penty, I.H. White, *Chem. Mater.*, 12, 2000, 2523
- ^{III} (a) S. Drane and J. A. McCleverty, *Polyhedron*, 1983, 2, 53; (b) S. Trofimenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 3904; (c) S. Trofimenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, 91, 588; (d) S. Trofimenko, *Inorg. Chem.*, 1969, 8, 2675
- ^{IV} S.-M. Lee, R. Kowalick, M. Marcaccio, J. A. McCleverty and M. D. Ward, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1998, 3443
- ^V S. M. Charsley, C. J. Jones, J. A. McCleverty, B. D. Neaves, S. J. Reynolds and G. Denti, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1988, 293
- ^{VI} (a) S. L. W. McWhinnie, C. J. Jones, J. A. McCleverty, D. Collison and F. E. Mabbs; *Polyhedron*, 1992, 11, 2639; (b) T.N. Briggs, C. J. Jones, H. Colquhoun, N. El Murr, J. A. McCleverty, B. D. Neaves, H. Adam, and N. A. Bailey, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1985, 1249
- ^{VII} V. A. Ung, A. M. W. Chargill Thompson, D. A. Bardwell, D. Gatteschi, J. C. Jeffery, J. A. McCleverty, F. Totti, and M. D. Ward; *Inorg. Chem.*, 1997, 36, 34

Mohammad B. Kassim, Jon A. McCleverty and Michael D. Ward

- ^{viii} (a). A. A. Rahman, A. A. Amoroso, T. N. Branston, A. Das, J. P. Maher, J. A. McCleverty, M. D. Ward and A. Wlodarczyk; *Polyhedron*, 1997, 16, 4353; (b). R. Cook, J. P. Maher, J. A. McCleverty, M. D. Ward, A. Wlodarczyk; *Polyhedron*, 1993, 12, 2111; (c). M. D. Ward, *Chem. Soc. Review*, 1995, 121; (d). N. C. Harden, E. R. Humphrey, J. C. Jeffery, S. M. Lee, M. Marcaccio, J. A. McCleverty, L. H. Rees, and M. D. Ward; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 2417; (e). V. A. Ung, A. M. W. Chargin Thompson, D. A. Bardwell, D. Gatteschi, J. C. Jeffery, J. A. McCleverty, F. Totti, and M. D. Ward; *Inorg. Chem.*, 1997, 36, 3447
- ^{ix} V. A. Ung, D. A. Bardwell, J. C. Jeffery, J. P. Maher, J. A. McCleverty, M. D. Ward and A. Williamson, *Inorg. Chem.*, 1996, 35, 5290
- ^x M. B. Kassim, 2003. *Studies of Nitrosyl and Oxo Molybdenum Complexes*, Ph. Thesis, University of Bristol, Bristol, United Kingdom
- ^{xi} M. D. Ward, *Chem. Soc. Review*, 1995, 121

Studi Kimia Kuantum Tahap Awal Pirolisis TNTA menggunakan (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida Sebagai Model

Muhamad A. Martoprawiro dan Nurul Irian Putra

Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia
muhamad@chem.itb.ac.id

Abstract

Senyawa TNTA (1,3,5-triazido-2,4,6-trinitrobenzena) merupakan salah satu material yang bersifat sangat eksplosif. Reaksi penguraiannya berlangsung sangat cepat dan menghasilkan produk akhir berupa karbon monoksida (CO) dan nitrogen (N₂). Telah dilakukan studi kimia kuantum terhadap mekanisme reaksi pirolisis (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida yang digunakan sebagai model reaksi pirolisis TNTA. Salah satu tahap awal reaksi berupa pembentukan struktur lingkaran lewat pelepasan N₂. Optimasi geometri, serta perhitungan frekuensi dan energi dilakukan awalnya pada tingkat teori Hartree-Fock (HF) dan Becke3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) dengan menggunakan himpunan basis 6-31G(d), dan dilanjutkan dengan tingkat teori yang lebih tinggi. Untuk tahap pembentukan lingkaran dan N₂, digunakan hipotesis dua macam mekanisme reaksi, yaitu reaksi bertahap, yang melibatkan dua keadaan transisi (TS1 dan TS2) dan satu senyawa antara *cis*-II, dan reaksi serempak, yang hanya melibatkan satu keadaan transisi TS3. TS1 dan TS3 berhasil diperoleh pada keadaan singlet, sedangkan TS2 dan *cis*-II berhasil diperoleh pada keadaan triplet. Perhitungan tetapan laju (*k*) tahap tersebut menghasilkan nilai sekitar $18 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Penggunaan 2-nitrofenil azida dipilih untuk melihat pengaruh lingkaran aromatik terhadap reaksi yang terjadi. Seperti telah diduga, walaupun diamati adanya pengaruh aromatik, tetapi pengaruhnya tidak terlalu besar terhadap mekanisme reaksi, karena gugus samping yang terlibat dalam reaksi amatlah reaktif. Kajian awal tahap-tahap selanjutnya pada mekanisme reaksi pirolisis TNTA setelah pembentukan lingkaran benzofuroksan telah pula dilakukan melalui kedua molekul di atas sebagai model

Paper is on page 1135

Equation of State of Fluid System : A Theoretical Approach

M. Utoro Yahya

Chemistry Department, Gadjah Mada University
Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia 55281
e-mail : utoroyahya@yahoo.com

Abstract

A continuity between the gaseous and the liquid state is recognized by the term fluid which means either a liquid or a gas. For a single phase fluid system, a liquid is defined as a fluid whose temperature is below the critical temperature and whose molar volume is less than critical molar volume, so that its density is greater than the critical density. If these conditions are not met, the fluid is called a gas.

Equation of state of fluid system could be obtained through the laws of thermodynamics and a mathematical operation called variable separation method, to develop an equation of state that would apply to liquids as well as gases, i. e.

$$\left(P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T\right)(V - V_0) = CRT \text{ or } V = V_0 + CR\left(\frac{\beta}{\alpha}\right).$$

Here $\left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T$ is an internal pressure, V is a molar volume, V_0 is a molar volume at zero Kelvin and C is a specific factor of the fluid system.

Furthermore, α is a thermal expansibility coefficient and β is an isothermal compressibility coefficient. Gaseous fluid has the value of $C = 1$ and for the liquid, $C \neq 1$ (enlarging of cluster size was indicated by $C < 1$, and downsizing of cluster size was expected by $C > 1$).

Keywords : fluid, equation of state, specific factor, thermal expansibility, isothermal compressibility

1. Introduction

Main data to be available and always been required to estimate the properties of substance in every study of chemical thermodynamics were pressure (P), volume (V), temperature (T) and mass (m) or number of moles (n), had been described by Garipis and Stamatoudis (1992), Furst and Rhenon (1993), Bienkowski *et al.* (1994), Chimowitz and Munoz (1995).

Equation of state constructed by such data mentioned above could be used to express phase equilibria of the system, to predict thermodynamic properties of the substance, and to figure out the properties of more complicated mixture of substances (Bienkowski, *et al.* 1994), Chimowitz and Munoz (1995).

Furthermore, Winhelman and Muller (1996)

declared that the equation of state could also express the properties, differences in accuracies and applications of substances in chemical industries.

The aim of this research is to find out the equation of state for the fluid system based on the continuity in property from the gaseous to liquid phase of the system as described by van der Waals (Orbey and Sander, 1995).

This fluid equation of state could be applied for gaseous as well as liquid fluid. A liquid is defined as a fluid whose temperature is below the critical temperature and whose molar volume is less than critical molar volume, so that its density is greater than the critical density. If these conditions are not met, the

fluid is called a gas (Levine, 1995).

2. Methodology

The equation of state of fluid system could be derived from the laws of thermodynamics and using a variable separation method based on the existence of continuity properties from gaseous to liquid phase of the system.

3. Discussion

Combination of the first and second laws of thermodynamics gives,

$$dU = TdS - PdV \quad (1)$$

$$\text{there fore } \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T = T\left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T - P \quad (2)$$

According to Maxwell relationship

$$\left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T = \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V \quad (3)$$

$$\text{hence } \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T = T\left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V - P \quad (4)$$

$$\text{or } P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T = T\left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V \quad (5)$$

Using the Chain Rule that is,

$$\left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V \left(\frac{\partial T}{\partial V}\right)_P \left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T = -1 \quad (6)$$

then equation (5) could be written as,

$$P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T = T\left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V = T\left(\frac{\alpha}{\beta}\right) \quad (7)$$

where $\alpha = \frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ = a thermal expansibility coefficient

and $\beta = -\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T$ = an isothermal compressibility coefficient.

Rearrangement of equation (7) give,

$$\left(\frac{\partial T}{\partial P}\right)_V = \frac{\beta}{\alpha} = \frac{T}{P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T} = f(V) \quad (8)$$

since equation (8) indicated the variation of $\frac{\beta}{\alpha}$ value at certain V (isochoric process). At T = 0 Kelvin then V = V₀ and f(V₀) = 0.

The relation between f(V) and f(V₀) are given by Taylor series as follows :

$$f(V) = f(V_0) + a(V-V_0) + b(V-V_0)^2 + \dots \quad (9)$$

where $a = \frac{f'(V_0)}{1!}$, $b = \frac{f''(V_0)}{2!}$ etc.

If the value of V approaching infinity then V₀ is neglected, so that

$$f(V) = a(V - V_0) + b(V - V_0)^2 = aV + bV^2 + \dots \quad (10)$$

At this condition, equation (10) is fulfilled by the ideal gas since at V approaching infinity then the pressure (P) of the system is approaching zero as required by the ideal gas property (very low pressure).

Therefore, for an ideal gas PV = nRT and $\left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T = 0$ hence the combination of equation (8) and (10) give

$$f(V) = aV + bV^2 = \frac{T}{P} = \frac{V}{nR} \quad (11)$$

As consequences, in order to be valid the equation (11) should give $a = \frac{1}{nR}$ and b = 0.

Furthermore, the equation of state for the fluid system is the combination of equation (8) and (9) to give,

$$f(V) = \frac{T}{P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T} = \frac{\beta}{\alpha} = \frac{1}{nR}(V - V_0) \quad (12)$$

$$\text{or } \left(P + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T\right)(V - V_0) = nRT \quad (13)$$

$$\text{and } nR\left(\frac{\beta}{\alpha}\right) = V - V_0 \quad (14)$$

For n = 1 then V = molar volume and V₀ = molar volume at zero Kelvin.

If V is plotted as the function of $\frac{\beta}{\alpha}$ then a

linear graph is obtained with a slope = R (a universal gas constant) and V_0 is the intercept. In case the slope is not equal R then it should be CR with C is a specific factor for the system. Based on the gas molecular kinetic theory, the gaseous fluid has a molecule as the smallest size of system, then $C = 1$ (Yahya, 2003).

While the liquid fluid has $C \neq 1$ since the smallest size of system is not expected to be a molecule but a cluster (a combined molecules). When $C < 1$, the fluid indicated the enlargement of cluster size and if $C > 1$, the fluid showed the downsizing of cluster size.

In this case, C is the ratio of actual size to a true size of cluster, where $C = \frac{a}{t} \neq 1$,

${}_tM_a = {}_aM_t$. M_a = actual cluster mass

M_t = true cluster

mass

4. Conclusion

The equation of state for the fluid system could be written in the form of,

$$\left\{ \left(P + \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T \right\} (V - V_0) = CRT \quad \text{or} \quad V - V_0 = CR \left(\frac{\beta}{\alpha} \right).$$

For gaseous fluid, the specific factor $C = 1$ and for the liquid $C \neq 1$.

The enlargement of cluster size of liquid is described by $C < 1$, while the downsizing of cluster size is expected by $C > 1$ due to molecular interaction in the liquid system.

5. References

Bienkowski, P.R., Syah, V.M., and Cochran, H.D. (1994). Generalized Quartic Equation of State, *AIChE Journal*, 40 (5), 788 - 792.

Chimowitz, E.H. and Munoz, F. (1995). Henry's Law and Synergism in Dilute Near Critical Solutions: Theory and Simulation, *AIChE Journal*, 41 (2), 389 - 401.

Furst, W. and Rhenon, H. (1993). Representation of Excess Properties of Electrolyte Solutions Using a New Equation of State, *AIChE Journal*. 39 (2), 335 - 343.

Garipis, D. and Stamatoudis, M. (1992). Comparison Generalized Equation of State to Predict Gas - Phase Heat Capacity, *AIChE Journal*, 38 (2), 302 - 307.

Levine, I.N. (1995). *Physical Chemistry*, McGraw Hill, Inc., New York.

Orbey, H and Sander, S.I. (1995). Reformulation of Wong-Sandler Mixing Rule for Cubic Equation of State, *AIChE Journal*, 41 (3), 683 - 690.

Winhelmann, J and Muller, A. (1996). Backbone Family of Equations of State : 1. Non Polar and Polar Pure Fluids, *AIChE Journal*, 42 (2), 1116 - 1126.

Yahya, M.U (2003). *The Unified State Equation of Natural Gas*, Simposium Nasional III, Kimia Fisik, Universitas Diponegoro, Semarang.



Assessment of Natural Radioactivity In Water and Sediment From Tin Tailing Area In Malaysia

Mohsen Nasirian & Ismail Bahari

Faculty of science and Technology,
University Kebangsaan Malaysia,
43600, Bangi, Selangor, Malaysia
e-mail: Mohsen_Nasirian@yahoo.com

Abstract

Gamma spectroscopy was performed in order to determine the concentration of natural radio nuclides in tin tailing or amang industries. In this study 32 water samples and 26 sediment samples were collected from 7 tin tailing plan area. The nuclides U-238 and Th-232 were determined by measuring the emission from it's daughters Bi-214 and Th-208. Nuclide K-40 and Ra-226 were used for measuring nuclide K and Ra respectively. Results show that the maximum of mass concentration of uranium and thorium in water samples are 6.363 ppm and 0.695 ppm respectively. The maximum concentration of uranium and thorium in sediment samples are 69.75 mg/kg and 157.73 mg/kg respectively. The maximum mass concentration of radio nuclides K-40 and Ra-226 in sediment samples are 30.69 mg/kg and 6.56×10^{-6} mg/kg. Concentration of uranium and thorium in sediment samples are higher than concentration of uranium and thorium in water samples, and it's due to insolubility of radio nuclides in water. Also results show that the concentration of radio nuclides in amang processing are higher than back ground and amang processing activity has increased the natural radio nuclides content in water, soil and sediment.

Paper is not available



Exploring differences in The Similarity of Lanthanide Polyether Complexes

Muhammad I. Saleh, Eny Kusriani, Rohana Adnan, Ismail A Rahman, Bahruddin Saad and Bohari M. Yamin*

School of Chemical sciences, Universiti Sains Malaysia, 1180, Penang, Malaysia

* School of Chemical Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor, Malaysia

Abstract

Lanthanide are very interesting class of metals due to their similarity in their chemical and physical properties and also their flexibility in the foormation of coordination compounds. In combination with multipledonor atom from ligands, very interesting similarity and dissimilarity in the formation of complexes in their solid state and liquid forms have been observed. In the present paper, the focus will be on the formation of complexes with oxygen donor from acyclic and cyclic polyetherrrs. The observation on cooordination behavior of the donor-acceptor atoms and the contribution of the counter anions to the stability of the complexes will also discussed. The presence of bulky counter anion pcrate having oxygen donor atoms have produced several solid state complexes with unique coordination behaviour and hydrogen-donor atoms interaction leading towards strong and weaks hydrogen bondings. From the observation on the ternary complex systems of lanthanide-crown ethers-picrate and lanthanide-polyethylene glycol-picrates with the same number of oxygen atoms of ether linkages revealed some (18C6) and pentaethylene glycol (EO5) in both of the ligand having six O donor atoms formed rather different coordination complexes even though the acyclic EO5 adopted 'cyclic-like' conformation. The cyclic ligand formed ten-coordinated complexes with six oxygen atoms from 18C6 and four from bidentate picrates. However, the acyclic ligand exhibitd a nine-coordinated complexes with six oxygen atoms from EO5 and two from one bidentate and one monodentate picrates.

Further investigations at structural level revealed some distinc differences in their coordination behaviour. Solid lanthanide complexes with cyclic (18-crown-6, 18C6 and dicyclohexane-18-crown-6, DCH18C6) and acyclic (triethylene glycole, EO3, tetraethylene glycol, Eo4 and pentaethylene glycol, EO5) with picrate as counter anion showed that lanthanum formed 10 coordination complexes for all cyclic and EO5 ligands. While Ce was able to form both 10 (crown ethers, EO3 and EO4 lidangs) and 9 (EO5 ligand). Other lantanide elements formed 10 coordination complexes with crown ethers and 9 when the ligands are acyclic. The stronger bonding of lanthanum (due to the highest cooordination number) of the solid state complexes can be used to explain the selectivity in solvent extraction. Almost 100% of lanthanum was extracted when diaza-18-crown-6 (DD18C6) was used as extractant compared with serium (20%) while thw rest of lanthanide elements wew negligible extracted.

Other physical and chemical prosperties are currently being pursued in order to establish the similarity and dissimilarity in coordination with cyclic and acyclic ligands for the entire series of lanthanide

Paper is not available

Kandungan Sebatian Fitokimia Dalam Daun dan Kaliks Tanaman Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) Pada Berlainan Kadar NPK

Herman, S., Mohamad O., Bakhendri, S., Ujang, S dan Muntaz, A.B

Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Abstrak

Ekstrak kasar daripada daun dan kaliks roselle telah disediakan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan metanol secara berurutan. Di dapati kadungan fitokimia ekstrak adalah alkaloid, saponin, steroid/triterpene dan BSLT_{LC50}. Ujian ke atas anak udang pula menunjukkan tiada kesan pada kepekatan 10 ppm tetapi menyebabkan kematian 100% pada kepekatan 1000 ppm. Hasil dari pada kajian ini dapat memberi maklumat awal tentang kandungan sebatian fitokimia dan kesan fitotoksiknya, disebabkan roselle digunakan sebagai herba tradisional dan ubat-ubatan.

1. Pendahuluan

Beberapa spesies daripada famili Malvaceae telah dikenal di Malaysia, tumbuhan bertabur di hutan kecil dan sudah dikebunkan oleh penduduk tempatan, beberapa spesies yang lain merupakan tumbuhan dengan pokok sederhana besar dan ada juga tumbuhan dengan ketinggian mencapai lebih enam meter ke atas (Kochummen 1978).

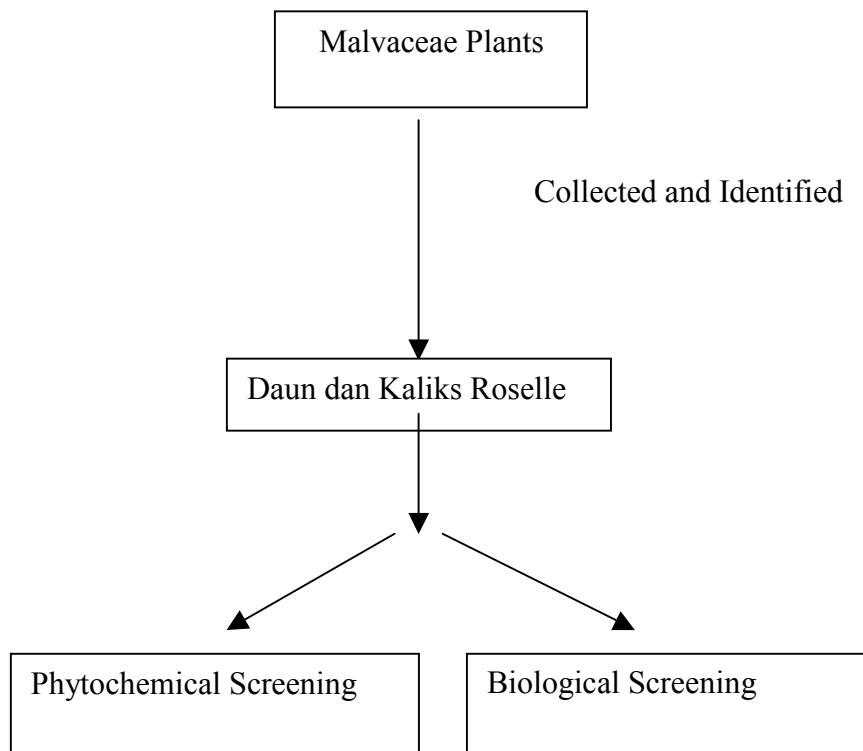
Buah-buah dan sayur-sayuran adalah sumber utama bekalan vitamin C dalam pemakan harian seperti buah limau, jambu batu, tomato, strawberi, black currant dan pada kebanyakan sayur-sayuran terutamanya sayur yang berwarna hijau. Hasil ekstrak kaliks roselle dengan kaedah penyemburan kering ('spray drying') mengadungi kadungan vitamin C yang tinggi, iaitu 82.76 mg/100g. Kadungan kelembapan kelopak segar adalah diantara 84% -89%. Di dalam komposisi kimia didapati roselle mengadungi kandungan vitamin C yang tinggi dan berfaedah dalam minuman yang disediakan darinya. Kadungan pectin pada kadar 7% adalah sesuai untuk kaliks dijadikan jem atau jeli (Purseglove 1968).

Kandungan biji roselle dengan kaedah

pengkstrakan dengan eter ialah lemak 0.70%, protein 29.0%, hasil ekstraksi bebas-N 32.9%, sebanyak 19.0% dan 18.0% hingga 22.0%. Pearatus asid lemak tak tepu dan asid linoleik dalam kandungan biji roselle adalah masing-masing 7.0% dan 44 % (Lee 2004).

Kandungan minyak biji roselle ialah 19.0-22.0%, asid lemak tak tepu 70.0% dan asid linoleik 44.0%. Rao (1996) dan Ahmad (1979) telah melaporkan jenis asid lemak dalam minyak roselle mengandungi asid miristik, asid palmitoleik, asid stearik cis-1 2, 1 3-ekspoksi-cis-9, asid okadesinoik, asid sterkulik dan asid malvalik, dengan menunjukkan julat 1.30 - 4.50%.

Alkaloid-alkoloid yang terkandung didalam Malvaceae adalah merupakan monoterpenoid indola. Ia menyamai apa yang terkandung dalam tumbuhan famili Loganiaceae iatu merupakan kadungan aktif kurar racun tumbuhan yang melupuhkan saraf atau neuron motor (Pelletier 1983). Ia mengadungi 3, 5-dihydroxy-2-[methylenylacetate] benzoic acid dan 2-Hydroxy-2',2',-dimethoxy acetic anhydride.



- Alkoloids
- Steroid/triterpenes
- Safonins

- # Brine Shrimp Cethality test
- # Antimikrobial Aktiviti
- # Cyotoxicity test

2. Bahan dan Kaedah

Kaedah yang dilakukan pada kajian ini adalah penanaman dua aksesori tanaman roselle iaitu Aksesori 6 dan Aksesori 2 sekaligus pengumpulan biji benih, daun, kaliks dan meliputi penanaman roselle, pembajaan, pengurusan air, kawalan rumpai, pengawalan penyakit dan serangga serta pemungutan hasil.

3. Hasil dan Perbincangan

Hasil yang diperolehi menunjukkan bahawa daun dan kaliks roselle tidak mempunyai kandungan alkaloid, terdapat kandungan steroid/triterpene dan safonin. Kandungan safonin adalah lebih banyak didapati dalam kaliks berbanding dalam daun. Adalah didapati bahawa pada keseluruhannya kandungan sebatian fitokimia dalam daun dan kaliks tidak menyebabkan kesan fitotoksik (Jadual 1). Kandungan sebatian fitokimia juga tidak dipengaruhi oleh kadar baja NPK yang berlainan.

4. Rujukan

Anonymous. 2002. Science and technology: getting red; the science of autumn. *Economist* 365: 105

Asher, C., Grundon, N., Menzies. 2002. *How to Unravel and Solve Soil Fertility Problems*. Canberra. Australian Centre For International Agricultural Research.

Departemen of Agriculture. 2000. *Teknologi Tanaman Industri. Roselle (Hibiscus sabdariffa L.)*

Corner, E. J. H., 1988 Wayside tree of Malaya. Vol.2. United Selangor Press. Kuala Lumpur .pp 754.

Faridah Mohd. Som 2000. *Roselle bunga enak dimakan*. Agromedia-Bil 8. MARDI.

Lee, M, Fah . 2004. Kajian kandungan asid lemak pada tujuh aksesori roselle (*Hibiscus sabdariffa L*) Tesis Sarjana muda Sains kejuruan Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.

Harborne, J. B., 1987. Metode Fitokimia. Edisi ke.2. Terjemahan, Penerbit ITB, Bandung pp. 234-245.

Heftmann, E., 1967. Chromatography. Edisi ke.2. Reinhold publishing Corporation, New York.

Hegnauer, R., 1978. Chemical Plant Taxonomy. Academy press, London. Pp. 389.

Metcalf, C. R & Chalk. 1950 anatomy of the dicotyledons, leaves stem and wood in Relation to

- taxonomy with notes on Economic Uses. Oxford at the Clarendon press. London : 1030.
- Mohamad, O. and Mohd. Nazir, B. (1997). The use of induced mutation in oil and industrial crops in malaysia. Proc. Seminar on mutation Breeding in oil and Industrial Crops: Regional Nuclear Cooperation in Asia, 12-18 october 1997, National Crop Experiment Station, RDA, Suwon, Korea.
- Mohamad, O., Arbayana, A., Mohd Nazir, B. and Azhar, A. (1999). Effects of colchicines on morpho-agronomic traits and ploidy level on roselle (*Hibiscus sabdariffa*). FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pasific Region, 11 - 15 October 1999, Manila, Philippines.
- Mohamad, O., Azhar, M. and Mohd . Nazir , B. (2000). Effects of colchicine on roselle. Bull. Genetics Soc. Malaysia 6(1&2):19-20.
- Mohamad, O., Mohd. Nazir, B., Azhar, M., Gandhi, R., Shamsudin, S., Arbayana, A., Mohammad Feroz, K., Liew, S.K., Sam, C. W., Nooreliza, C. E. and Herman, S. (2002). Roselle improvement through conventional and mutation breeding. In: Proc. International Nuclear Conference 2002, 15-18 October 2002, Kuala Lumpur, pp. 104-123.
- Mohamad, O., Herman, S. Mohd. Nazir, B., Shamsudin, S. and Takim, M. (2003). A Dosimetry Study Using Gamma Irradiation on Two Accession, PHR and PH1, In Mutation Breeding of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L). Simposium Biology 3 and 4 MINES.
- Mohd. Nazir, B., Mohamad, O.,Affrida, A. H. and Sakinah, A. 1998. Research highlights on the use of induced mutations for plant improvement in Malaysia. MINT, bangi, 87p.
- Mohamad, O. and Herman. S., 2003. Roselle accession at UKM, Bangi. School of Environmental and Natural Resource Sciences Faculti of Science and Technologi, UKM, Bangi. MSAB Symposium on 2-4 June, 2003. (tidak diterbitkan).
- Mohammad, F. K., 2000 Kesan kolkisin dan nitrogen terhadap cirri-ciri morfo-agronomi pada tanaman roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) Tesis Sarjana muda Sains. Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Mohamad, O., Herman, S. Mohd. Nazir, B., Bakhendri, S & Abdul Rahman, M. 2004. Germplasm Accssions and crop improvement of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Malaysia.MSMBB Sientific Meeting 19 – 21 July 2004, Century Mahkota Malaka.
- Mohamad, O., Herman, S., & Bakhendri, S. 2004. kesan Aras Baja NPK terhadap Pertumbuhan Tanaman Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Prosiding Seminar bersama FST, UKM – FMIPA, UNRI ke 3, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia.
- Malaysia Agrculltural Directory & Index 2000/2002: major agricultural industries. 2000. Ed. Ke-8. Malaysia: Agriquest Sdn.Bhd.
- MARDI.1998. Minit Mesyuarat Lembaga Pengarah Marditech Corporation Sdn. Bhd.
- Ng, L. Yee., 2004. Kajian pembajaan nitrogen terhadap kadungan antosianin pada tiga aksesori roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) Tesis Sarjana muda Sain kepujian Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.
- Rao, P.U. 1996 Plannt foods Hum. Nutr., 49 (1): 27-34.
- Sharine, C. I.Lynn., 2004. Kajian kadungan Vitamin C dan kesan baja nitrogen terhadap tiga aksesori roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) Tesis Sarjana muda Sain kepujian Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.
- Samuel, O.N. & Kevin, S. G. 2003. *Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?*. Functional Plant Biology 30: 865-873.
- Tan Soon Chye. 1990. *Biokimia Tumbuhan Hiaju*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa & Pustaka.

LAMPIRAN

Jadual 1. Kandungan sebatian fitokimia dalam daun dan kaliks roselle.

NPK	Aksesi	Alkaloid		Steroid/ Triterpene		Safonin		BSLT _{LC50}		Cyotoxicity	
		Daun	Kalik	Daun	Kalik	Daun	Kalik	Daun	Kalik	Daun	Kalik
0 kg/ha	1	-ve	-ve	+	+	2+	2+	196	174	0	0
	2	-ve	-ve	+	+	1+	2+	196	211	0	0
80 kg/ha	1	-ve	-ve	+	+	1+	2+	298	269	0	0
	2	-ve	-ve	+	+	1+	2+	269	248	0	0
120 kg/ha	1	-ve	-ve	+	+	2+	2+	196	269	0	0
	2	-ve	-ve	+	+	1+	2+	211	211	0	0
180 kg/ha	1	-ve	-ve	+	+	2+	2+	183	196	0	0
	2	-ve	-ve	+	+	2+	2+	211	269	0	0

Keterangan:

* Alkaloid (-ve) = Tiada Alkaloid

* Steroid/Triterpene (+) = Ada Alkaloid

* Safonin = Tanaman yang paling banyak dijumpai 4 +

* BSLT_{LC50} = Angka-angka ini mengguna tiga sampel anak udang, bagi 10 ppm dan 1000 ppm

Sifat-sifat Pentabletan Akarmanis (*Radix Glycyrrhizae*)

Widianingsih dan Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin

Jabatan Farmasi, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia,
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300, Kuala Lumpur
Malaysia

Abstrak

Akarmanis (Radix glycyrrhizae) secara tradisional telah lama digunakan sebagai eksipien dalam pembuatan pil atau jamu. Serbuk radix glycyrrhizae berasal dari akar yang dikeringkan yang kemudiannya dikisar halus, daripada tanaman glycyrrhiza glabra L. dan beberapa spesies lain (glycyrrhiza uralensis Fisch., Liguirita officinalis Moench). Tumbuhan ini banyak terdapat di selatan Asia Tenggara, Mediteranian, Eropah Selatan dan India. Tujuan kajian ini adalah untuk mengetahui sifat fizikokimia radix glycyrrhizae sebagai bahan eksipien untuk pembuatan tablet dengan kaedah pemampatan terus dibandingkan dengan eksipien yang telah secara luas digunakan dan tersedia di pasaran industri farmaseutik. Saiz partikel yang digunakan dalam kajian ini adalah 200-250 μ m. Sifat ikatan dari serbuk ini dikaji dengan menghitung kekuatan tegangan dengan kaedah pemampatan diametral. Hubungan antara komposisi campuran dan kekuatan tegangan dikaji dengan menggunakan pelbagai daya mampatan dengan keliangan. Hasil kajian didapati bahawa radix glycyrrhizae memiliki ketumpatan sebenar serbuk 1.5746 g/cc, maksimum daya mampatan pada 20 kN dengan kekuatan tegangan 0.1181 kN/cm², maksimum beban tablet 84.41 N manakala kajian analisis Heckel pula menunjukkan bahawa radix glycyrrhizae bersifat aliran plastik. Hasil pengujian ke atas sifat pemampatan dan pepadatan didapati bahawa radix glycyrrhizae boleh digunakan sebagai eksipien dalam pembuatan tablet dengan kaedah pemampatan terus. Imbasan elektron mikroskop menunjukkan partikel yang pelbagai saiz dan bentuk yang tidak seragam. Hasil kajian juga menunjukkan bahan ini setanding dengan bahan komersial digunakan dalam formulasi tablet.

Kata kunci: *eksipien, kekuatan tegangan, pemampatan diametral, radix glycyrrhizae*

1. Pendahuluan

Kesukaran memahami proses pemampatan tablet telah menjadi asas kajian dijalankan pada komponen secara individu. Disebabkan kebanyakan tablet mengandungi campuran satu atau lebih komponen, kajian mengenai jangkaan sifat pemampatan tablet daripada komponen asal menjadi lebih menarik.

Hasil kajian oleh Sheikh Salem dan Fell (1981) mendapati penambahan sedikit laktosa ke dalam natrium khlorida menyebabkan pengurangan ketara dalam kekuatan tensile. Kesan ini didapati pada tekanan pemampatan dan saiz partikel yang berbeza. Amin dan Fell (2002) mengkaji kekuatan tensile dan tenaga

bebas permukaan dari campuran tablet dedua menggunakan ujian pemampatan diametral dan ujian pelenturan tiga titik (*three-point bending*) untuk komponen pemplastik. Kesimpulannya ujian pemampatan diameter merupakan cara yang sah dalam menilai ikatan tablet berbanding sifat semulajadi heterogenous bahan termampat daripada komponen pemplastik.

Pemilihan eksipien untuk formulasi tablet dengan kaedah pemampatan terus merupakan sesuatu yang kritikal. Ini kerana eksipien tersebut haruslah memenuhi beberapa kriteria yang diperlukan bagi membolehkannya diproses secara pemampatan terus. Saiz partikel

yang tertabur secara seragam memudahkan proses pencampuran. Ketercampuran dengan eksipien atau dadah lain juga merupakan suatu perkara yang penting. Biasanya 0.5 hingga 70% atau lebih daripada jumlah berat akhir tablet adalah merupakan bahan aktif.

Terdapat kira-kira 14 ciri-ciri ideal yang perlu dimiliki oleh eksipien yang ingin digunakan di dalam kaedah pemampatan terus, seperti mengalir dengan bebas, mudah dimampatkan serta menghasilkan tablet dengan profil kekerasan, tekanan yang baik, lengai secara fisiologi dan tidak mengganggu bioketersediaan dadah, tiada tindakbalas kimia dengan dadah, tidak mempunyai rasa dan warna serta murah harganya. Eksipien untuk kaedah pemampatan terus juga haruslah boleh dimampatkan semula tanpa kehilangan sifat aliran dan keternampatannya serta mampu membentuk tablet yang mengandungi kadar bahan termampatkan yang tinggi. (Saringat 1984; Sheth et al. 1980)

Dalam kajian ini eksipien yang digunakan ada empat jenis dengan dua bahan yang bersifat aliran plastik iaitu selulosa mikrohablur (MCC) dan Radix Glycyrrhizae, serta dua yang bersifat pecahan rapuh iaitu laktosa semburan kering dan kalsium laktat pentahidrat (Puracal).

Selulosa mikrohablur (MCC) atau Avicel PH101, digunakan dengan meluas dalam bidang farmaseutikal sebagai bahan penfikat atau pencair pada tablet dan kapsul yang digunakan secara oral. MCC memiliki sifat aliran partikel yang sederhana, mudah dimampatkan dan dapat menghasilkan tablet dengan kekerasan tekanan yang berpatutan.

Kalsium laktat pentahidrat atau Puracal, merupakan pilihan baru sebagai bahan pengikat tablet dengan penggunaan kaedah pemampatan terus. Ianya memiliki sifat mengalir dengan bebas, mudah dimampatkan dan menghasilkan tablet dengan sifat kekerasan yang baik (G.K Bolhuis et.al 2001).

Glycyrrhizae radix diperolehi dari akar glycyrrhizae yang dikeringkan, merupakan tanaman species Glycyrrhizae Glabra, familia Leguminosae. Nama lain tanaman ini adalah Liquiritae Officinalis dengan nama tempatan Akarmanis. Serbuk ini berwarna coklat memiliki rasa yang manis. Di Indonesia biasa digunakan sebagai bahan pengisi pada pembuatan pil. Kandungan yang paling banyak

adalah Triterpene, Saponin, Glycyrrhizin (glycyrrhizic acid, glycyrrhizinic acid).

2. Experimental

Ujian pemampatan dan kepadatan.

Ujian ini menggunakan mesin pemampat hidraulik dengan acuan dan penebuknya yang direka khas. Serbuk sebanyak 500 mg ditimbang dan magnesium stearat 1% dalam acetone digunakan sebagai pelincir. Tekanan yang digunakan adalah di antara 2 sehingga 9 tan.

Ketumpatan pepejal

Mesin yang digunakan adalah Ultra Pycnometer 1000 (Quanta Chrome). Serbuk yang akan diuji dikeringkan dahulu dalam oven pada suhu 40° C, selama 24 jam, kemudian di simpan di dalam desikator pada suhu bilik. Serbuk ditimbang sebelum masukkan dalam piknometer dan dibiarkan selama 30 minit untuk menstabilkan suhu.

Elektron Mikroskop Imbasan (S.E.M)

Mesin yang digunakan ialah mikroskop elektron imbasan. Serbuk yang akan diimbas diletakkan di atas plat nipis dan dimasukkan ke dalam ketuhar pada suhu 37° C selama 15 minit untuk mengurangkan kelembapan agar tidak mengganggu pengimbasan objek. Setelah itu dimasukkan ke dalam alat *sputter coater* untuk dilapisi dengan emas 99% sebelum diletakkan di dalam mikroskop.

Ujian kelembapan dan tegasan pengenduran

Serbuk dikeringkan terlebih dahulu di dalam ketuhar pada suhu 50° C selama 96 jam sebelum diuji. Serbuk yang tidak dikeringkan diletakkan di dalam desikator pada 70% kelembapan pada suhu bilik dan digunakan sebagai kawalan. Alat ujian yang digunakan adalah *Universal Testing Machine* (Instron 5567) dengan acuan dan penebuk. Serbuk ditimbang 500 mg sebelum dicetak dan diletakkan di dalam desikator sebelum dipecahkan dengan kaedah pemampatan diametral pada setiap 2, 4, 6, 24, 26, 28, 48, 50, 52 dan 96 jam tablet dengan menggunakan Instron. Tablet dari serbuk yang tidak dikeringkan disimpan di dalam desikator pada 70% kelembapan di dalam suhu bilik sebelum diuji.

Kekuatan tegangan

Kekuatan tegangan adalah nilai yang diperolehi dari ikatan antara partikel yang dicapai semasa proses pemampatan serbuk. Kaedah yang

digunakan untuk menghitung nilai kekuatan tegangan adalah dengan,

$$\text{Kekuatan tegangan} = 2P/\pi DT$$

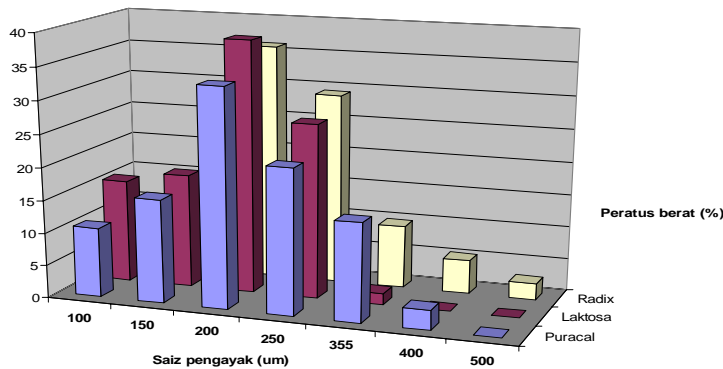
di mana,

- P = maksimum beban tablet (Newton)
- D = diameter tablet (mm)
- T = tebal tablet (mm)

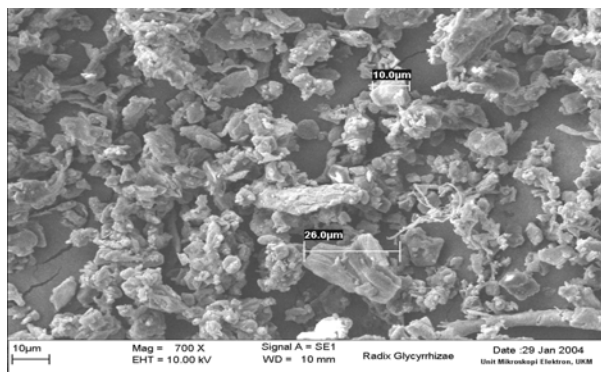
3. Hasil dan pembahasan

Analisa awal menunjukkan majority partikel yang digunakan adalah di antara 200-250 μm (Rajah 3.1) manakala bentuk partikel radix glycyrrhizae menunjukkan kepelbagaian bentuk yang tidak seragam (Rajah 3.2).

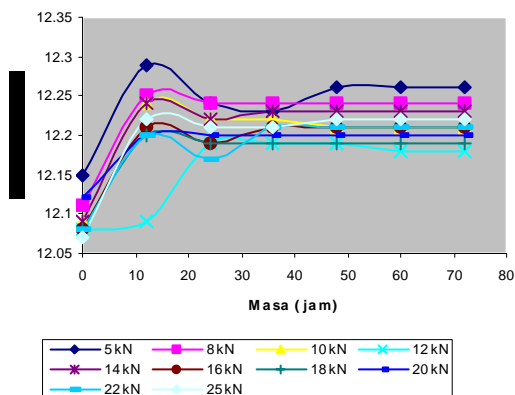
Rajah 3.3a-3.3d, menunjukkan bahawa semua jenis tablet mengalami pengembangan diameter dan ketebalan pada 12 jam pertama selepas



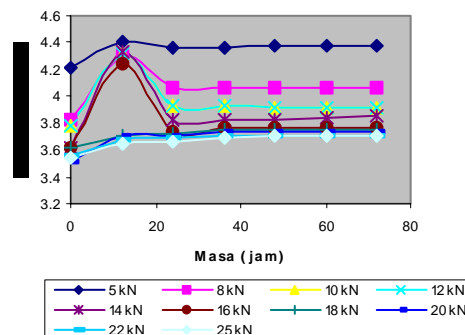
Rajah 3.1: Analisa saiz partikel



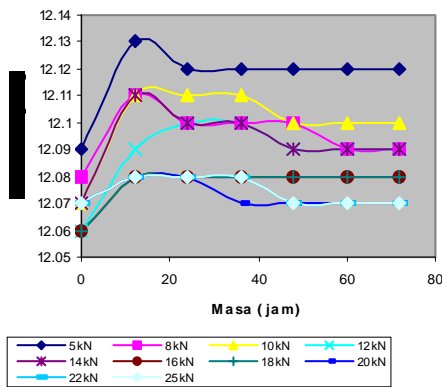
Rajah 3.1: Analisa saiz partikel



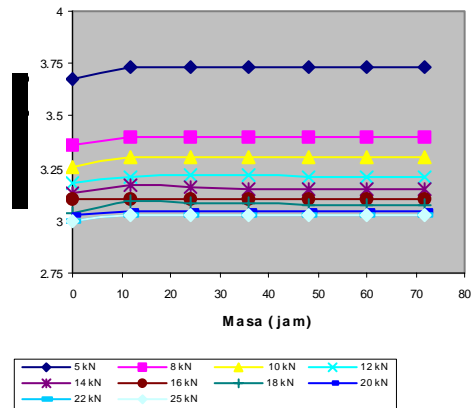
Rajah 3.3a: Pengembangan diameter (mm) tablet lawan masa (jam) bagi radix glycyrrhizae



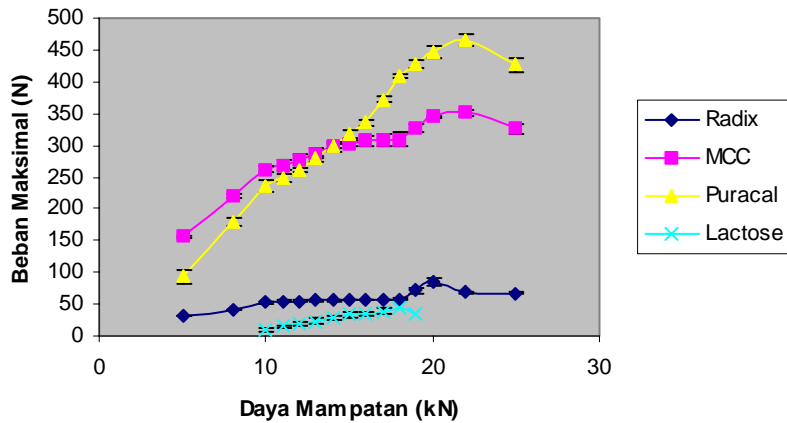
Rajah 3.3b: Pengembangan ketebalan (mm) tablet lawan masa (jam) bagi radix glycyrrhizae



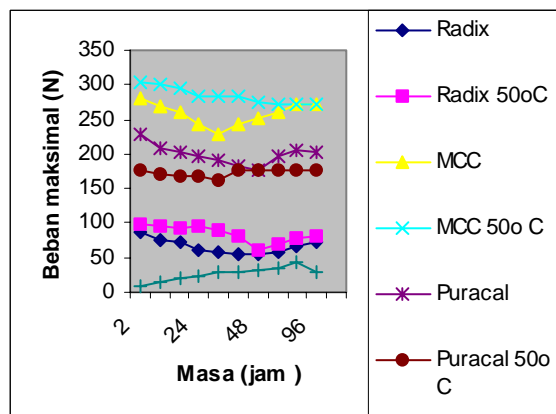
Rajah 3.3c: Penembangan diameter (mm) tablet lawan masa (jam) bagi MCC



Rajah 3.3d: Pengembangan ketebalan (mm) tablet lawan masa (jam) bagi MCC



Rajah 3.4: Perbandingan daya mampatan lawan beban maksimum bagi MCC, Puracal, laktosa dan radix glycyrrhizae

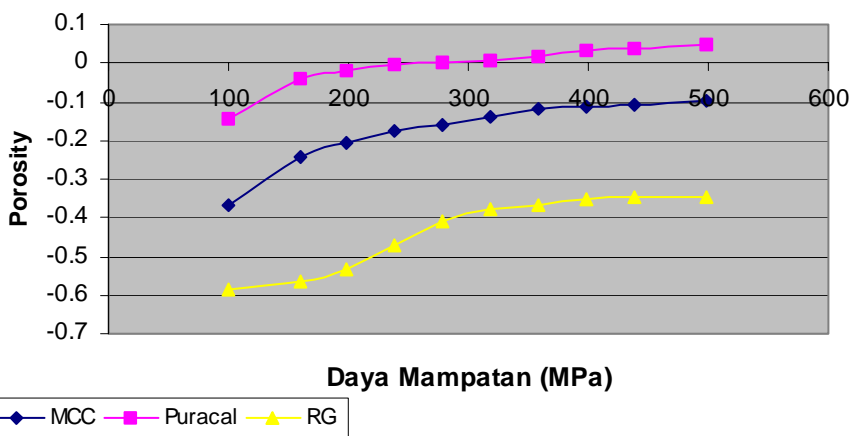


Rajah 3.5: Kesan pengeringan terhadap beban maksimum tablet

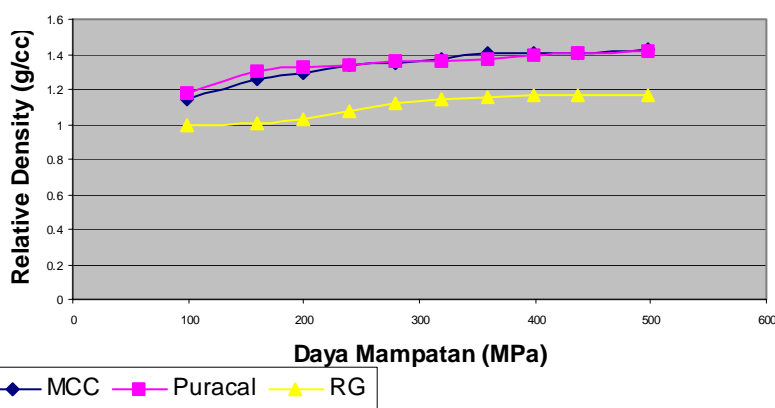
pemampatan. Pengembangan terbesar terjadi pada tablet radix glycyrrhizae diikuti oleh tablet MCC, dan tablet Puracal. Pengembangan tablet akan menurun berikutan peningkatan daya mampatan.

Pada Rajah 3.4 menunjukkan bahawa peningkatan daya mampatan akan diikuti

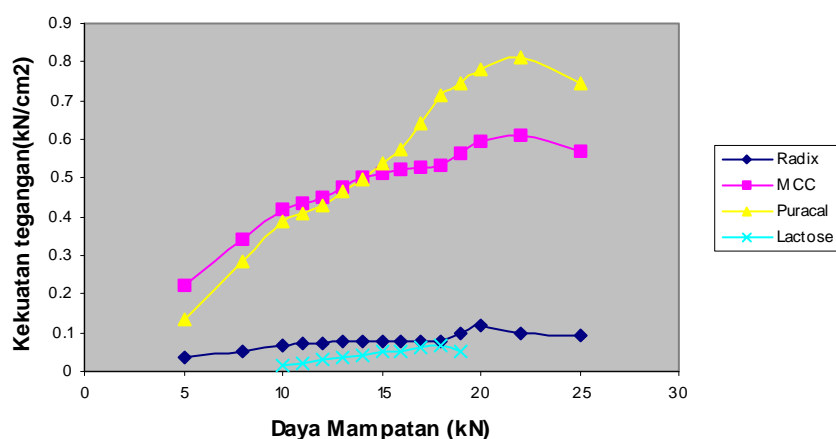
peningkatan beban maksimum tablet, namun pada daya mampatan yang maksimal, beban maksimum tablet akan menurun. Hal ini disebabkan peningkatan daya mampatan akan meningkatkan keluasan sentuhan interpartikulat dan akan meningkatkan kekuatan tablet, namun pada daya mampatan maksimum



Rajah 3.6: Kesan peningkatan daya mampatan terhadap porosity bagi MCC, Puracal dan radix glycyrrhizae



Rajah 3.7: Kesan peningkatan daya mampatan terhadap relatif density tablet bagi MCC, Puracal dan radix glycyrrhizae

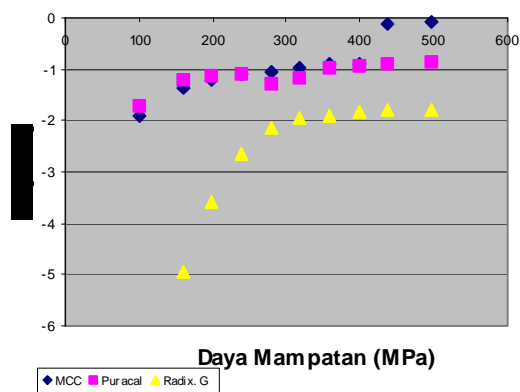


Rajah 3.8: Peningkatan daya mampatan terhadap kekuatan tegangan tablet (kN/cm²) bagi MCC, Puracal, laktosa dan radix glycyrrhizae.

keliangan/*porosity* tidak dapat dikurangkan lagi sehingga tablet malah menjadi rapuh. Puracal memiliki beban maksimum yang tertinggi iaitu: 465,52 N pada daya mampatan 22 kN, radix glycyrrhizae 84.41 N pada daya mampatan 20

kN hasil ini lebih tinggi berbanding laktosa semburan kering.

Setelah serbuk dikeringkan pada suhu 50 darjah Celcius selama 96 jam, ternyata memberi kesan pada beban maksimal tablet. Rajah 3.5



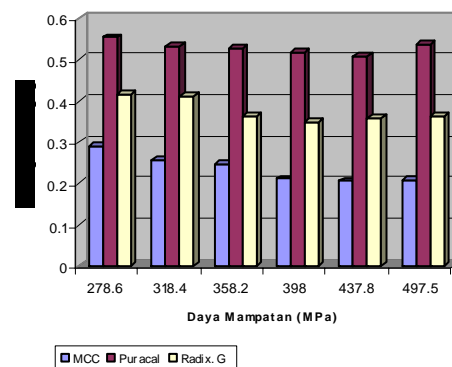
Rajah 3.9: Analisa Heckel

menunjukkan bahawa MCC setelah dikeringkan maka beban maksimal tablet akan meningkat berbanding jika serbuk tersebut tidak dikeringkan, mungkin ini disebabkan sifat dari MCC yang higroskopik. Begitu pun pada radix glycyrrhizae, hal ini mungkin kerana pengolahan serbuk radix yang masih tradisional hingga kandungan air masih terlalu tinggi. Namun perkara ini tidak berlaku pada Puracal, ia malahan mengalami penurunan beban maksimal tablet setelah pengeringan, ini disebabkan sifatnya yang *brittle*/rapuh.

Rajah 3.6 menunjukkan bahawa peningkatan daya mampatan akan meningkatkan nilai daripada porositi. Radix glycyrrhizae memiliki nilai yang rendah berbanding serbuk lain, hal ini disebabkan kerana tablet radix memiliki kekuatan mampatan dan kekuatan tegangan yang rendah berbanding yang lain. Peningkatan daya mampatan akan meningkatkan nilai ketumpatan relatif sebagaimana berlaku pada radix glycyrrhizae kerana tablet yang dihasilkan memiliki isipadu yang lebih besar berbanding yang lain (Rajah 3.7).

Umumnya, peningkatan daya mampatan akan meningkatkan kekuatan tegangan diikuti dengan peningkatan beban maksimal tablet. Namun sifat aliran serbuk sama ada rapuh ataupun pemplastik serta bentuk partikel mempengaruhi ikatan antara partikel di dalam sesuatu tablet. Rajah 3.8, menunjukkan bahawa Puracal memiliki nilai lebih tinggi iaitu 0.8101 kN/cm², sedangkan pada radix hanya 0.1181 kN/cm².

Analisa Heckel yang terdapat pada Rajah 3.9 menunjukkan bahawa radix glycyrrhizae



Rajah 3.10: Uji kerapuhan tablet

memiliki plot yang menyerupai sifat bahan pemplastik, oleh itu diperkirakan mempunyai sifat pemplastik meskipun harus dilakukan kajian lebih lanjut untuk membuktikannya.

Merujuk pada Rajah 3.10, Puracal ternyata memiliki faktor kerapuhan yang lebih tinggi berbanding bahan lain, mungkin ini disebabkan sifat rapuh yang dimilikinya. Radix glycyrrhizae mempunyai kerapuhan yang masih dapat diterima untuk digunakan sebagai eksipien tablet, iaitu 0.4%.

4. Kesimpulan

Glycyrrhizae radix boleh digunakan sebagai eksipien tablet dengan menggunakan kaedah pemampatan terus. Ianya memiliki sifat-sifat aliran bahan pemplastik, memiliki beban maksimum, kekuatan tegangan dan kerapuhan yang lebih baik berbanding laktosa. Glycyrrhizae radix berpeluang untuk dijadikan eksipien tablet secara komersial dan meluas kerana memiliki sifat yang baik dan terbukti selamat untuk digunakan secara oral.

5. Ucapan Terimakasih

Universiti Kebangsaan Malaysia (Jabatan Farmasi-Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, Fakulti Kejuruteraan) IRPA No. 09-02-02-0095EA239

6. Daftar Pustaka

British Pharmacopoeia (BP). 1993. London: Her Majesty's Stationary Office.

B. Van Veen, K. van der Voort Maarschalk, G.K. Bolhuis, K.Zuurman, H.W. Frijlink., (2000). Tensile strength of tablets containing two materials with a different compaction behaviour. Int. J. Pharm. 203, 71:79.

Widianingsih dan Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin

- Luangtana-anan M and Fell J T., (1990). Bonding mechanisms in tableting. *Int. J. Pharm.* 60:19
- M C I Amin and Fell J T., Tensile strength and bonding in compacts, a comparison of diametral compression and three point bending for plastically deforming materials. *Drug Dev and Ind Pharm.* 28:809.
- Newton J M, Cook D T and Hollebon C E., (1977). The strength of tablets of mixed components. *J. Pharm. Pharmacol.* 29:247.
- Osmo Antikainen, Jouko Yliruusi., (2003). Determining the compression behaviour of pharmaceutical powders from the force distance compression profile. *International journal of pharmaceutics* 252. 253:261.
- Padma Narayan, Bruno C. Hancock., (2003). The relationship between the particle properties, mechanical behavior, and surface roughness of some pharmaceutical excipient compacts. *Materials science and engineering A* 355. 24:36.
- Yeli Zhang, Yuet Law and Siby Chakrabarti., (2003). Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders. *AAPS PharmSciTech* 1:10

Kandungan Radionuklid Tabii Dalam Sampel Amang, Tanah dan Air di Sekitar Kawasan Industri Perlombongan di Dengkil Selangor

Muhamad Samudi Yasir¹⁾, Amran Ab.Majid²⁾ & Redzuwan Yahaya³⁾

- 1) Program Sains Nuklear, Pusat Pengajian Fizik Gunaan, msyasir@pkisc.cc.ukm.my
- 2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan amran@pkisc.cc.ukm.my
- 3) Program Sains Nuklear, Pusat Pengajian Fizik Gunaan, redzuwan@pkisc.cc.ukm.my
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Abstrak

Kandungan radionuklid tabii ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K dalam sampel mineral amang tulen, amang mentah, tanah dan air yang diambil dari loji pemprosesan amang, kawasan perumahan dan kawasan bekas lombong di Dengkil, Selangor Darul Ehsan telah ditentukan menggunakan kaedah spektrometri gama. Keputusan analisis menunjukkan julat keradioaktifan tentu (Bq/kg) ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K masing-masing dalam sampel amang tulen dan amang mentah adalah 52.83 – 3538.94, 24.45 – 13426.68, 149.63 – 22011.87 dan 108.04 – 3773.15. Manakala julat keradioaktifan tentu (Bq/kg) ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K dalam sampel tanah pula masing-masing adalah 31.64 – 449.15, 27.37 – 103.08, 32.42 – 976.65 dan 181.74 – 462.42. Bagi sampel air pula, julat keradioaktifan tentu (Bq/L) ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K masing-masing adalah 1.40 – 1.63, 1.57 – 1.65, tidak terkesan – 0.76 dan 11.44 – 12.06. Secara amnya keradioaktifan tentu ^{238}U dan ^{226}Ra paling tinggi dalam sampel ilminit mentah dan zirkon tulen, manakala bagi ^{232}Th keradioaktifan tentu tertinggi ditemui dalam sampel monazit tulen dan monazit mentah. Sementara itu bagi keradioaktifan tentu ^{238}U , ^{232}Th dan ^{226}Ra dalam tanah dan air didapati lebih tinggi bagi kawasan persampelan berhampiran dengan loji pemprosesan amang. Walaupun perkiraan menunjukkan dos setara tahunan yang boleh diterima oleh pekerja kilang amang adalah rendah, nilai dos ini diperngaruhi oleh kuantiti amang yang terdapat di persekitaran. Oleh yang demikian kajian lanjut perlu dilakukan bagi menganggarkan dos sebenar yang mungkin akan diterima oleh pekerja.

Kata kunci: amang, dos setara, air, radionuklid tabii

1. Pendahuluan

Aktiviti perlombongan bijih timah di Malaysia telah bermula sejak pertengahan kurun ke 18. Industri perlombongan ini memuncak pada tahun 1970an, sehingga menyumbang antara 75 - 80% dari jumlah nilai mineral Malaysia di samping mengeluarkan 30.77% keluaran timah

dunia. Walau bagaimanapun penurunan dan ketidakstabilan harga pasaran di samping kekurangan kandungan mineral mengakibatkan industri ini terus menurun. Menjelang tahun 1996 hanya terdapat 63 buah lombong timah yang masih aktif beroperasi (Jabatan Perlombongan Malaysia, 1997). Sungguhpun

begitu penurunan aktiviti perlombongan timah telah meningkatkan aktiviti industri pemprosesan sisa timah iaitu amang atau tahi timah. Amang diproses untuk mengekstrak pelbagai mineral berharga seperti ilmenit, zirkon, monazit, xenotim dan struverit. Industri ini telah berkembang dengan pesat dan pada tahun 1995-1997 berada pada kedudukan ke empat dalam sektor perlombongan negara. Selain mengandungi pelbagai mineral berharga, amang juga mengandungi pelbagai unsur radioaktif. Radionuklid ini terdiri dari radionuklid tabii atau NORM (Naturally Occuring Radioactive Material) ataupun yang telah dipertingkatkan secara teknologi ketika pengasingan bijih ataupun amang, iaitu TENORM. Antara unsur radioaktif yang dikenalpasti terdapat pada amang adalah radium-226 (^{226}Ra), uranium-238 (^{238}U), torium-232 (^{232}Th) dan kalium-40 (^{40}K). Radium-226 terhasil melalui siri pereputan ^{238}U yang turut menghasilkan radon-222. Torium-232 pula melalui siri pereputannya turut menghasilkan toron-220. Kedua-dua progeni ini berbentuk gas dan memungkinkan untuk memasuki tubuh melalui saluran pernafasan. Dedahan dalaman ini boleh mengakibatkan kesan radiologi yang signifikan.

Pembangunan yang pesat telah menyebabkan keperluan untuk menebusguna kawasan bekas lombong. Selain untuk dibangunkan menjadi kawasan perindustrian, kawasan bekas lombong turut juga dimajukan sebagai kawasan perniagaan dan perdagangan, perumahan serta rekreasi dan perlancongan di samping menjadi tapak pertanian dan ternakan. (Amran Ab Majid et al., 2004). Oleh kerana kehadiran radionuklid tabii dan TENORM di kawasan bebas lombong ini boleh meningkatkan resiko radiologi, kajian perlu dilakukan bagi menentukan aras beberapa radionuklid tabii. Oleh yang demikian kawasan di Dengkil ini dipilih kerana ia merupakan kawasan bekas lombong serta mempunyai loji pemprosesan amang yang masih beroperasi di samping terletak di kawasan yang sedang pesat membangun. Kajian merangkumi penentuan aras pelbagai radionuklid seperti ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K pada sampel amang tulen, tanah dan air. Dos setara tahunan hasil dedahan daripada ^{226}Ra ini turut ditentukan.

2. Percobaan

Lokasi pensampelan

Pensampelan dilakukan di sekitar kawasan Dengkil, Sepang Selangor Darul Ehsan (Rajah 1). Lokasi pensampelan dibahagikan kepada empat kawasan, iaitu S1 : kawasan industri pemprosesan amang (Universal Minerals Trading Sdn Bhd), S2 : kawasan bekas lombong (persekitaran E-village), S3 : kawasan perumahan Taman Dengkil Jaya dan S4 : kawasan perkampungan.

Jenis sampel

Sampel yang diambil adalah amang (S1), tanah dan air. Sampel amang yang diambil ialah timah tulen, monazit tulen, ilmenit tulen, zirkon tulen dan longgokan monazit dan ilmenit. Sampel air diambil dari kolam efluen loji pemprosesan amang, tasik bekas lombong dan juga takungan yang terdapat di lokasi pensampelan. Sampel tanah diambil menggunakan penyodok tanah pada kedalaman sekitar 15 cm. Sampel tanah dimasukkan ke dalam beg plastik dan diikat. Sampel air dimasukkan ke dalam bekas plastik berpenutup yang kemudiannya ditambahkan beberapa titik asid nitrik pekat (Redzuwan Yahaya et al., 1997).

Perawatan sampel

Sampel amang dan tanah yang telah dibersihkan dari pelbagai bendasing dikeringkan di dalam ketuhar pada suhu 80°C hingga 90°C selama 48 jam, atau sehingga sampel mencapai berat yang tetap. Sampel kemudiannya dilerai dan dihancurkan sebelum ditapis menggunakan penapis pada saiz 0.8 mm. Hasil ayakan yang diketahui beratnya disimpan dalam bekas polietilena berpenutup dan kemudiannya dikedapkan dengan pita pelekat. Sampel seterusnya disimpan pada suhu bilik selama 30 hari untuk mencapai keseimbangan sekular. Piawai kaedah bandingan yang diguna dalam kajian ini ialah Soil-375 (IAEA).

Sampel air ditapis untuk mengasingkan keladak dan bendasing lain. Sampel, 2000 cm^3 disejatkan di dalam bikar setelah ditambah beberapa titik asid nitrik untuk mengelakkan kandungan air dari melekat pada dinding bekas. Pemanasan dilakukan menggunakan pemanas elektrik sehingga isipadu air mencapai sekitar 250 cm^3 . Isipadu akhir ini dimasukkan ke dalam bekas polietilena berpenutup. Masa keseimbangan 30 hari juga dilakukan

sebagaimana sampel tanah. Piawai yang diguna adalah larutan uranium dan torium dengan kepekatan 100 ppm.

Pembilangan

Selepas melepasi tempoh keseimbangan semua sampel dan piawai dibilang aktiviti menggunakan sistem pembilang sinar gama HPGe-PCA (Tennelec-Nucleus) selama 12 jam.

Penentuan radionuklid

Penentuan unsur dilakukan dengan perbandingan tenaga puncak foton sampel dengan piawai. Tenaga puncak foton yang diguna untuk pengenalpastian radionuklid ialah 1.76 MeV (²³⁸U), 2.62 MeV (²³²Th) dan 1.46 MeV (⁴⁰K). Kepekatan ²²⁶Ra diperolehi secara tidak langsung, iaitu dengan mengukur aktiviti ²¹⁴Bi, anak pereputan ²²⁶Ra pada puncak foton 609.3 keV. Pengukuran ²²⁶Ra langsung pada puncak foton 186.2 keV tidak dapat dilakukan kerana terdapat gangguan oleh ²³⁵U yang mempunyai puncak foton 185.7 keV. Sistem pembilang gama yang diguna tidak mampu membezakan kedua-dua puncak foton ini (Muhamad Samudi Yasir et al., 2001).

Perkiraan keradioaktifan

Oleh kerana faktor geometri, masa pembilangan dan lain-lain parameter pembilangan sama antara sampel dan piawai, maka kandungan radionuklid boleh dikira berdasarkan rumus:

$$W_s = \frac{M_p \times A_s}{M_s \times A_p} \times W_p \text{ (Bq/kg)}$$

W_s kepekatan radionuklid dalam sampel (Bq/kg) atau (Bq/L)

W_p kepekatan radionuklid dalam piawai (Bq/kg) atau (Bq/L)

M_s jisim sampel diguna (g) atau (ml)

M_p jisim piawai diguna (g) atau (ml)

A_s aktiviti radionuklid dalam sampel (kps)

A_p aktiviti radionuklid dalam piawai (kps)

Penentuan dos setara tahunan

Perkiraan dos setara tahunan dilakukan hanya terhadap radionuklid ²²⁶Ra kerana

kesignifikannya dari sudut keselamatan radiologi. Perkiraan berdasarkan pada jarak dedahan 1 meter. Nilai dedahan untuk 1 Ci ²²⁶Ra pada 1 meter adalah 0.825 R/jam (Jaeger et al., 1968). Dos dedahan pada 1 meter adalah:

$$\text{dos dedahan} = \frac{0.825}{1} \times A_t \text{ R/jam}$$

A_t aktiviti sumber (Ci)

$$\text{dos terserap} = \frac{0.825}{1} \times A_t \times 0.93 \text{ rad/jam}$$

$$= \frac{0.825}{1} \times A_t \times 0.93 \times 0.01 \text{ Gy/jam}$$

dos setara H

$$H = \text{DQN (Sv/jam)}$$

D dos terserap (Gy)

Q faktor qualiti = 1

N lain-lain faktor pengubahsuaian = 1

Dos setara tahunan pekerja kilang amang ditentukan berdasarkan waktu kerja selama 2000 jam setahun.

3. Hasil dan pembahasan

Kandungan radionuklid dalam sampel amang

Kandungan radionuklid yang ditentukan dalam pelbagai sampel amang dinyatakan dalam Jadual 1. Hasil kajian mendapati semua radionuklid yang dikaji terdapat dalam sampel amang. Walau bagaimanapun keradioaktifan tentu radionuklid tersebut berbeza-beza. Keradioaktifan tentu ²³⁸U tertinggi dan terendah dicerap pada masing-masing sampel ilmenit longgokan (3538.94 Bq/kg) dan timah tulen (52.85 Bq/kg). Radionuklid ²³²Th pula tertinggi dikesan pada sampel monazit tulen dan longgokan dengan nilai keradioaktifan tentu masing-masing 13426.68 Bq/kg dan 12452.18 Bq/kg. Corak yang sama juga dicerap pada radionuklid ²²⁶Ra. Keradioaktifan tentu ²²⁶Ra juga tinggi pada sampel monazit. Keradioaktifan tentu ⁴⁰K adalah yang paling rendah berbanding dengan radionuklid lain. Keradioaktifan tentu ⁴⁰K rendah dalam semua

sampel kecuali monazit tulen (3773.15 Bq/kg) dan longgokan monazit (3239.73 Bq/kg).

Keradioaktifan tentu semua radionuklid adalah terendah pada sampel timah tulen. Keadaan ini memang dijangkakan kerana timah tulen ini dihasilkan setelah mineral-mineral lain yang mengandungi radionuklid diasingkan. Walau bagaimanapun keradioaktifan NORM dalam mineral timah tulen ini akan dapat dikurangkan apabila ia melalui proses peleburan bagi menghasilkan jongkong timah. Ini juga menunjukkan bahawa proses pengasingan mineral telah dilakukan dengan sempurna.

Kandungan radionuklid dalam sampel tanah

Lokasi pensampelan tanah dan air meliputi berbagai corak aktiviti kegunaan tanah. Kawasan pertama adalah sekitar loji pemprosesan amang. Manakala kawasan ke dua adalah di sekitar E-village; iaitu kawasan bekas lombong yang kini sedang giat dibangunkan sebagai kawasan hiburan dan rekreasi. Kawasan Taman Dengkil Jaya merupakan kawasan perumahan yang terletak berhampiran loji pemprosesan amang dikategorikan sebagai kawasan ketiga, manakala kawasan perkampungan yang terletak agak di luar dari kawasan pembangunan sebagai kawasan ke empat. Keradioaktifan tentu dalam sampel tanah dari keempat-empat kawasan ini ditunjukkan dalam Jadual 2.

Keradioaktifan tentu ^{238}U dalam sampel tanah dari pelbagai lokasi pensampelan berada dalam julat 31.64 - 449.15 Bq/kg. Untuk ^{232}Th pula nilainya adalah antara 27.37 - 103.08 Bq/kg, manakala untuk ^{226}Ra dan ^{40}K adalah masing-masing 32.42 - 976.65 Bq/kg dan 181.74 - 462.42 Bq/kg. Secara umumnya bacaan ^{238}U tinggi di kawasan berhampiran loji pemprosesan amang (S1) dan kawasan bekas lombong di sekitar E-village (S2) serta terendah pada kawasan perkampungan (S4). Nilai yang tinggi ini adalah hasil sumbangan aktiviti pemprosesan amang dan sisa tinggalan aktiviti perlombongan. Corak yang sama juga diperolehi untuk ^{226}Ra , manakala untuk ^{232}Th keradioaktifan tentunya tidak banyak berbeza kecuali di kawasan tepi loji pemprosesan amang yang mana nilainya agak lebih tinggi (103.08 Bq/kg). Oleh yang demikian keradioaktifan tentu yang lebih tinggi ini berpunca dari sisa aktiviti perlombongan dan pemprosesan amang. Keradioaktifan tentu ^{40}K

tidak terlalu berbeza kecuali di kawasan Taman Dengkil Jaya yang mencatatkan nilai tertinggi (462.42 Bq/kg). Selain dari kewujudan ^{40}K tabii, aktiviti manusia seperti pembajaan boleh meningkatkan kandungannya. Kajian yang telah dilakukan oleh Muhamad Samudi Yasir et. al. (2001) juga mendapati taburan keradioaktifan tabii (^{238}U , ^{232}Th dan ^{40}K) serta radionuklid guguran ^{137}Cs dipengaruhi oleh faktor seperti perbezaan keadaan geologi dan aktiviti pembangunan.

Kandungan radionuklid dalam sampel air

Keradioaktifan tentu ^{238}U dalam sampel air berada pada julat 1.40 - 1.63 Bq/L, manakala untuk ^{232}Th , ^{226}Ra dan ^{40}K pula masing-masing pada julat 1.57 - 1.65 Bq/L, tidak terkesan - 0.76 Bq/L dan 11.44 - 12.06 Bq/L (Jadual 3). Bagi radionuklid ^{226}Ra penentuan dilakukan menggunakan kaedah langsung, iaitu berdasarkan puncak foton 186 keV. Ini disebabkan hanya puncak ini yang dapat dikesan pada larutan piawai yang diguna. Secara amnya keaktifan tentu kesemua radionuklid yang terdapat dalam sampel air tidak berbeza antara lokasi pensampelan.

Dos setara bagi dedahan sampel amang

Jadual 1 menunjukkan bahawa keradioaktifan tentu ^{226}Ra dalam pelbagai sampel amang adalah tinggi. Salah satu progeni ^{226}Ra ialah radon (^{222}Rn). Oleh kerana ^{222}Rn adalah berbentuk gas, ia boleh memasuki saluran pernafasan dan terperangkap dalam paru-paru sebagai ^{210}Pb ataupun ^{210}Po . Radium juga boleh menggantikan kalsium sebagai struktur tulang. Oleh yang demikian kesan radiologi ^{226}Ra ke atas manusia khususnya pekerja loji pemprosesan amang adalah signifikan. Kajian telah dilanjutkan dengan mengira dos setara pada jarak dedahan 1 meter. Hasil perkiraan dapat dilihat dalam Jadual 4. Didapati dos setara meningkat dengan keradioaktifan tentu ^{226}Ra . Walau bagaimanapun nilai maksimum yang diperolehi (9.12×10^{-3} mSv/tahun pada monazit tulen) masih lebih rendah dari paras maksimum dedahan orang awam (1 mSv/tahun) ataupun pekerja sinaran (50 mSv/tahun). Nilai yang dicerap ini juga masih lebih rendah dari nilai 0.100 mSv, iaitu dos setara berkesan luaran bagi siri pereputan ^{238}U . Sungguhpun begitu nilai dos setara ini hanya terpakai bagi kuantiti amang yang rendah (nilai dos dikira hanya berdasarkan satu kg sampel). Oleh itu nilai dos setara ini akan meningkat dengan

kuantiti sampel. Ini dapat dilihat dalam kajian Azlina et. al. (2003). Mereka mendapati jika kawasan bekas loji pemprosesan amang ini terus dibangunkan dos setara tahunan yang diterima oleh penduduk atau pekerja akan melebihi had dos tahunan orang awam. Ini disebabkan kuantiti longgokan amang yang terdapat sememangnya berada dalam kuantiti yang banyak. Berdasarkan hasil kajian menggunakan model RESRAD mereka seterusnya mencadangkan beberapa langkah mitigasi termasuk penimbusan lapisan tanah di atas bekas tapak loji tersebut perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum pembangunan dilakukan.

4. Kesimpulan

Hasil kajian ini mendapati keradioaktifan tentu radionuklid ^{238}U , ^{232}Th dan ^{226}Ra tinggi pada sampel amang berbanding sampel tanah, manakala keradioaktifan tentu ^{40}K tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan. Kedudukan lokasi pensampelan turut mempengaruhi keradioaktifan tentu radionuklid tersebut. Semakin hampir lokasi tersebut dengan kawasan bekas lombong atau loji pemprosesan amang, keradioaktifan tentu pada sampel tanah semakin meningkat. Bagi sampel air tidak terdapat perbezaan yang signifikan ke atas keradioaktifan tentu radionuklid. Keradioaktifan tentu ^{226}Ra pada sampel amang adalah tinggi. Walaupun perkiraan menunjukkan dos setara tahunan yang boleh diterima oleh pekerja kilang amang adalah rendah, nilai dos ini dipengaruhi oleh kuantiti amang yang terdapat dipersekitaran. Oleh yang demikian kajian lanjut perlu dilakukan bagi menganggarkan dos sebenar yang mungkin akan diterima oleh pekerja.

5. Penghargaan

Setinggi ucapan terima kasih dan penghargaan ditujukan kepada Syarikat Universal Mineral

Trading Sdn. Bhd. yang telah membekalkan perbagai sampel amang yang digunakan dan Universiti Kebangsaan Malaysia yang membiayai Seminar ini.

6. Daftar Pustaka

Amran Ab Majid, Muhamad Samudi Yasir, Redzuwan Yahaya. (2004), Taburan Radionuklid Tabii (NORM) dan Kaitannya dengan Aktiviti Pembangunan di Negeri Selangor. Dalam: *Indicator of Sustainable Development: Assessing Changes in Environmental Conditions*. A. Latiff et al., (Ed), Institute For Environment and Development (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia, ISBN 983-9444-58-1, hal. 213 – 225.

Azlina, M.J., B. Ismail, M. Samudi Yasir, Syed Hakimi Sakuma and M.K. Khairuddin, (2003). Radiological Impact Assessment of Radioactive Minerals of Amang and Ilmenite on Future Landuse Using RESRAD Computer Code. *Applied Radiation and Isotope* 58 413 - 419.

IAEA. The Use of Gamma Ray Data to Define The Natural Radiation Environment. IAEA-TECDOC-566 : 1 - 10.

Jabatan Perlombongan Malaysia, (1997). Statistic on Commodities 1997. hal. 177 - 185.

Jaeger, R.G., et al., (1968). Engineering Compendium on Radiation Shielding, vol.1. Springer-Verlag, New York. Hal. 21.

Muhamad Samudi Yasir, Ismail Bahari, Sahibin A.R., Dahlia Suriati, Halim Abd Rahman, (2001). The Concentration of Natural Radionuclides and Heavy Metals in Soils From a Tin-Mining and its Surrounding Area. *Jurnal Sains Nuklear Malaysia*, 19: 50 – 56.

Redzuwan Yahaya, Che Rosli Che Mat, Muhamad Samudi Yasir, Amran Ab Majid, Ismail Bahari dan Sukiman Sarmani, (1997). Analysis of Fall-out and Naturally Occuring Radioactive Elements in Selangor. *Malays. J. Anal. Sci.* 3 : 237 - 241.

Jadual 1 : Keaktifan tentu radionuklid dalam sampel amang (Bq/kg)

Jenis sampel radionuklid /	^{238}U	^{232}Th	^{226}Ra	^{40}K
timah tulen	52.83 ± 4.85	24.45 ± 3.0	149.63 ± 20.23	108.04 ± 8.97
monazit tulen	832.88 ± 90.56	13426.68 ± 2100	22011.87 ± 2590	3773.15 ± 380.98
ilmenit tulen	76.31 ± 7.71	97.28 ± 9.88	2099.29 ± 210.65	154.66 ± 16.87
zirkon tulen	2620.98 ± 250.65	204.83 ± 20.32	8898.21 ± 900.32	179.64 ± 18.05
monazit longgokan	246.36 ± 20.40	12452.18 ± 800.58	13573.32 ± 2510	3239.73 ± 150.66
ilmenit longgokan	3538.94 ± 250.65	132.44 ± 5.75	822.64 ± 50.85	3219.64 ± 205.75

Jadual 2 : Keradioaktifan tentu radionuklid dalam sampel tanah (Bq/kg)

Lokasi pensampelan		^{238}U	^{232}Th	^{226}Ra	^{40}K
S1	Sekitar Loji Amang	294.46 ± 15.25	103.08 ± 8.25	976.65 ± 5.25	181.74 ± 6.23
S2	Sekitar E-village	449.15 ± 25.32	37.52 ± 1.55	105.75 ± 1.75	247.28 ± 8.80
S3	Taman Dengkil Jaya	57.98 ± 6.05	49.68 ± 3.26	86.64 ± 0.49	462.42 ± 35.33
S4	Kawasan Perkampungan	31.64 ± 5.22	27.37 ± 3.25	32.42 ± 0.25	262.24 ± 15.58

Jadual 3 : Keaktifan tentu radionuklid dalam sampel air (Bq/L)

	Lokasi pensampelan	^{238}U	^{232}Th	^{226}Ra	^{40}K
(S1)	Sekitar Loji Amang	1.52 ± 0.22	1.65 ± 0.35	0.71 ± 0.07	11.75 ± 1.55
(S2)	Sekitar E-village	1.63 ± 0.25	1.57 ± 0.33	*t.d	11.75 ± 1.55
(S3)	Tasik Taman Dengkil Jaya	1.40 ± 0.15	1.57 ± 0.33	0.76 ± 0.07	11.44 ± 2.04
(S4)	Kawasan Perkampungan	1.52 ± 0.22	1.65 ± 0.35	0.66 ± 0.06	12.06 ± 2.03

t.d. : tidak terkesan

Jadual 4 : Dos setara dan dos setara tahunan

Nama sampel	^{226}Ra (Bq/kg)	dos setara (Sv/jam)	dos setara tahunan (mSv/tahun)
monazit tulen	22011.87	4.55 x 10 ⁻⁹	9.12 x 10 ⁻³
ilmenit tulen	2099.29	4.30 x 10 ⁻¹⁰	8.60 x 10 ⁻⁴
zirikon tulen	8898.21	1.84 x 10 ⁻⁹	3.68 x 10 ⁻³
monazit longgokan	13573.32	2.00 x 10 ⁻⁹	5.62 x 10 ⁻³
ilmenit longgokan	822.64	1.70 x 10 ⁻¹⁰	3.24 x 10 ⁻⁴



Development of Organic Light Emitting Diode in Malaysia: a Next Generation of Flat Panel Display Technology

Muhammad Yahaya, Muhamad Mat Salleh and Mursyidah

School of Applied Physics
Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, MALAYSIA

Abstract

Organic polymer would certainly be the material of choice in the fabrication of large area and flat electronic display devices such as in advertisement and billboards. In this application, polymer materials can easily be processed into large-area thin films using simple and inexpensive technology. The polymers are lightweight and flexible, and many of their properties can be adjusted to suit specific needs. In 1989, a research group from University of Cambridge discovered that organic polymer could be incorporated in light emitting diode. Since this discovery, the field of Polymer LEDs has attracted much attention in many laboratories. Polymer LEDs devices are composed of three thin polymer layers, which are called the hole transporting layer, luminescent layer and electron transporting layer. These polymer-based devices were found to require low voltage of electricity and suitable for large area applications. This paper will report on OLED activities in Malaysia particularly R&D works in electronic display industry. As for the research institution, UKM has played an important role in initiating OLED activities. UKM has successfully developed the polymer light-emitting device with the ITO/PVK/PDPV/Alq3/Al structure with maximum brightness of 1300 cd/m².

1. Introduction

The flat panel industry has been dominated by liquid crystal displays (LCD) Technology. LCD technology is advancing so rapidly that it will be difficult for other technologies to compete in the market place, despite all the efforts and innovation from research laboratories. A new approach is to look for cheaper and versatile materials such as organic and nanomaterials. Traditionally, organic materials are confined to subjects in chemistry and biology. This trend may change in the future with the development of polymers and other molecular materials that can emit light and conduct electricity in the order of \square A. Organic materials offer some advantages over their inorganic counterparts; they are durable, flexible and relatively cheap to mass-produce. During the last ten years, many electronics companies are embarking on this new field of

research. Product designers are dreaming up giant video screens that can be rolled up and carried from room to room, mobile phones with all-plastic circuitry and lightweight luminous panels in aero planes and cars. It is expected that both organic and nanomaterials will give a major impact on the flat panel display industry.

Malaysia has set its course for a transformation into a knowledge-driven economy. Its strategy for growth is to focus on high technology and knowledge intensive activities. What is the strategic research in new materials for display technologies? . Commercialization of the organic optoelectronics depends on many factors such as efficiency, color, and most importantly stability. There have been extensive research efforts by industry and university aimed at understanding of the mechanisms involved. This paper will address some of the issues above in relation to OLED

technologies being developed in Malaysia.

2. Display Technology

The industry of display technology is rapidly changing. One of the critical question in ITC industry and consumer electronics is the choice of display technology used to reproduce the colour for viewing. The three main technologies in the display area are LCD (Liquid Crystal Display), CRT (Cathode Ray Tube), and Plasma. New technologies are beginning to enter the market place such as OLED (Organic Light Emitting Diode); EL (Electro Luminescent), LED (Gas as Light Emitting Diode), MEMS (Micro-Electromechanical System); LCOS (Liquid Crystal on Silicon); VF (Vacuum Fluorescent); and Cholesteric (Bi-Stable Cholesteric). The focus of most technologies is how to combine color elements of R (red), G (green) and B (Blue) so as to look like a real representation. In the Table 1 below, the three most common technologies are displayed for comparison purposes.

OLED is a very attractive candidate as display devices and for other consumer applications. Since Tang et al¹. reported the discovery of organic electroluminescence devices, OLED has been widely studied by many researchers and even already developed as commercial products. OLED has advantages such as low power consumption, light weight and thin, many efforts are being made to develop a mobile display with OLED. In addition, OLED displays have excellent features such as :

- a) high luminescence (Over than 100 000 cd /m²)
- b) high light emission efficiency (over 10 lm /w)
- c) possible low operating voltage
- d) fast response time (\square s)

Organic EL is obtained simply by placing a charge-transporting and light-emitting organic material between two electrodes (one of which is transparent) and applying a suitable bias. Figure 1 shows the general structure of OLED.

The organic material may be either a polymer or low molecular weight molecules deposited by evaporation in vacuum. Total device thickness without substrate is less than 1

micron. When biased, charge is injected into the highest occupied molecular orbital (HOMO) at the anode, and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) at the cathode, and these injected charges known as "holes" and "electrons," respectively migrate in the applied field until two charges of opposite polarity encounter each other, at which point they recombine and produce a radiative state. Early works by Burroughes², et al. at Cambridge have reported a single-layer device made with a polymeric material, poly(phenylene vinylene) (PPV). Reviews on OLED and synthetic chemistry has been extensively described by Walker³ et al.

3. Research and Development of OLED in Malaysia

Malaysia is new in photonic industry and has benefited from the presence of Multinational companies (MNC). Some of the Malaysian companies, such as Photronics, Optical Communication, OPCOM Cables, Photon Technologies and Dominant Semiconductors have also ventured into the manufacturing of photonics and related products. Malaysia's electronic and electrical (E&E) sector remains a major contributor to its economy, registering a growth of 5 percent in the first quarter of 2004. Also the global demand for electronic products, estimated at \$1.35 trillion in 2003, is anticipated to increase by about 12 percent in 2004. E&E industry is forecast to grow stronger in 2004, but the main question is when the OLED business will be profitable. R&D in OLED has progressed at a remarkable pace. The key issues are materials lifetime process technologies. There are some 60 companies with active OLED programs and consolidation has already begun. Table 3. shows some photonic company operating in Malaysia

According to the National IRPA Registry (Intensification of Research in Priority Area), these are projects on LED funded under the sixth and seventh Malaysia Plan

(UKM:Universiti Kebangsaan Malaysia, USM:University Sains Malaysia, UM: Universiti Malaya)

Currently UKM is the only university that seriously pursue works on OLED . The project

was started in 2003 with seed funding from the MOSTI with the following objectives;

- a) To study organic materials as basic components for fabricating blue light emitting diode.
- b) To study optimum parameters for fabrication light emitting diodes.
- c) To fabricate and characterized blue organic light emitting diodes
- d) To transfer OLED technology to flat-panel-display industries.
- e) To develop a low-cost fabrication process for OLED displays adaptable by the local display industry

We have purchased the evaporation equipment to fabricate OLED devices.

Preliminary works in OLED has been discussed by Mursyidah et al⁵. PLED were fabricated using poly(9-vinylcarbazole), PVK, poly(4,4'-diphenylene diphenylvinylene), PDPV and tris(8-quinolinolato) aluminum thin films. Figure 1 shows the molecular structures of organic compounds for our OLEDs. Performances of the device have been investigated through the current-voltage (I-V) curve, electroluminescence spectrum and the luminance. The device shows emission spectrum in the range of 430-620 nm. The device was operated with turn-on voltage of 7.5 V. The maximum brightness was 1300 cd/m².

Figure 2 shows the normalized emission spectrum of ITO/PVK/PDPV/Alq₃/Al device. The device has a broad emission spectrum, which spans the range of 430-620 nm with a peak wavelength at 540 nm. The spectrum indicates a green light emission range.

5. Nanostructured materials for OLED

Organic materials are confined to subjects in chemistry and biology. This trend may change in the future with the development of polymers and other molecular materials that can emit light and conduct electricity. The advantages of organic over inorganic materials are their excellent in color range and high fluorescence efficiency. Light is produced in organic materials by the fast decay of excited molecular states, and the color of light depends on the energy difference between those excited states and the ground level. In most organic materials

the charge carriers are either electrons or holes with their mobilities in the range of 10⁻⁸ to 10⁻² cm²/(V s). Electron mobility in organic materials is generally lower than hole mobility. Combining organic and nanomaterials both are expected to have major impact on the flat panel display, will bring major changes in the manufacturing of OLED and LCD. Nanomaterials by themselves, or mixed with other materials to form a composite material, have been shown to possess many enhanced properties. These enhanced properties have been shown to be much more beneficial than conventional materials in the micron size range. Nanomaterials, especially in the solid or crystalline form, are high value-added materials. Although many exciting new applications of nanomaterial have been developed in the microelectronics, automotive, aerospace, petrochemical, bio-science, pharmaceutical and opto-electronics industries, yet the high costs of production have been a significant deterring factor for more rapid development of new applications.

6. Conclusion

In a highly competitive market, industries rely on total commitment to research & development, innovation, quality, and customer satisfaction. Hence collaboration between Universities and industries are essential to tap the valuable resources for enhancement of newly developed field.

UKM has successfully developed the polymer light-emitting device with the ITO/PVK/PDPV/Alq₃/Al structure with maximum brightness of 1300 cd/m². However, the turn-on voltage of the device $V_{on} = 7.5$ V was considered too high.

Production costs present greatest challenge in OLED industry. The target is to get high efficiency displays with low power and economical to manufacture.

7. Acknowledgements

We wish to thank Mr Akrajas for many helpful discussions. Part of the work has been carried out with the support of the Ministry of Science, Technology and Environment, Malaysia and Universiti Kebangsaan Malaysia under the IRPA -09-02-02-0041 grant.

8. References

Tang, C.W., Van Slyke, S.A. and Chen, C.H. (1989). J. Appl. Phys. 65, 3610

Muhammad Yahaya, Muhamad Mat Salleh and Mursyidah

Burroughes, J.H., Bradley, D.D.C., Brown, A.R., Marks, R.N., Mackay, K., Friend, R.H., Burn,

P.L. and Holmes, A.B. 1990. "Light-emitting diodes based on conjugated polymers", *Nature* 347: 539-541

Walker, A.B., Kambili, A. and Martin, S.J. (2002). *J. Phys.: Condens. Matter* 14:9825–9876

Hung, L.S. and Chen, C.H. (2002). *Materials Science and Engineering*, R 39:143–222.

Mursyidah, Muhamad Mat Salleh and Muhammad Yahaya. 2001. Light emitting diode based on poly(4,4'-diphenylene diphenylvinylene)/tris(8-quinolinolato)aluminium structure. *J. Sol. Sta. Sci. and Technol. Lett.*, 8(1&2):63-68 (ISSN:0128-7389)

LAMPIRAN

Table 1. Display technologies.

Display Type	Principles of operation	Advantages
CRT (Cathode Ray Tube)	An electrons are accelerated by high-voltage anodes, formed into a beam by focusing electrodes, and projected toward a phosphorescent surface with R, G, and B molecules within a vacuum tube	a) Relatively cheap b) Commonly accepted protocol for displays c) use emissive technology - this means images can be viewed from any angle.
LCD(Liquid Crystal Display)	An electric field is applied to a liquid crystal substance, with a backlight blocking the appropriate molecules to create color	a) Thinner than a CRT b) Consume less power than LED, since the objective is to block molecules rather than combine them c) LCDs emit fewer low-frequency electromagnetic emissions
Plasma Neon/Xenon Gas Plasma	Cavities within the screen contain phosphorus that are activated when gas is moved through the screen	No latency time-the material is instantly activated. Very bright, thin, color display

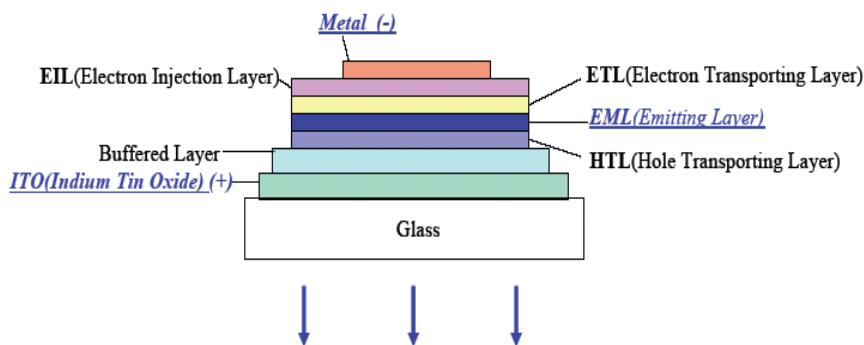


Figure 1 : The general structure of OLED

Table 3. OLED industries in Malaysia and neighboring country

Company	Location	Activity
OSRAM Opto Semiconductors	OSRAM Opto Semiconductors (Malaysia) Sdn. Bhd. Bayan Lepas Free Industrial Zone Phase 1 11900 Bayan Lepas Penang Malaysia	Osram Opto Semiconductors is combining its OLED products and technologies under the Pictiva brand name. Osram holds a license from Cambridge Display Technology to manufacture and sell polymer light emitting displays. Osram currently manufactures OLED displays in evaluation quantities at Penang, Malaysia
Ness Display Co Ltd., a South Korean startup company,	P.O.BOX 25, Kyeonggi-do, 449-860, Korea	This company plans to invest \$40 to \$60 million on the construction of an OLED plant in Singapore. Economic Development Board has pledged up to \$12.5 million to the company as part of an effort to encourage manufacturing in the area.
Eastman Kodak	Kodak Malaysia Sdn Bhd Jalan Kemajuan 13-1 46200 Petaling Jaya Selangor, Malaysia	Eastman Kodak is introducing high-performance materials for the manufacture of OLED displays. Kodak's ground-breaking OLED formulation includes four colors: red, green, blue and white
Cambridge Display Techn.	Cambridge Display Techn. Greenwich House, Madingley Rise, Madingley Rd. Cambridge, England CB3 0TX United Kingdom	In 2003, CDT announces availability of world's first complete in-line manufacturing line for PLED displays, using precision ink jet printing technology
VARITRONIX (MALAYSIA) SDN. BHD.	Plot 40, Bayan Lepas Free Industrial Zone, Phase 4, 11900 Penang, Malaysia	Varitronix has completed a 1000 sq. ft. cleanroom to house OLED R&D facility. Facilities to be installed in Varitronix's headquarter in Hong Kong . The facilities include a batch type front-of-line for 7x7 glass substrates and a multi-chamber vacuum evaporator with dry box for organic layers and cathode deposition. The R&D OLED line will produce about 200 monochrome OLED displays per day

TABLE 4 : Projects on LED funded under the sixth and seventh Malaysia Plan

Projects	Institution
Fabricating Blue Organic Light Emmiting Diodes (OLED)	UKM
Developments of Blue Light Emitting Devices	USM
Development of LED and OLED	UM

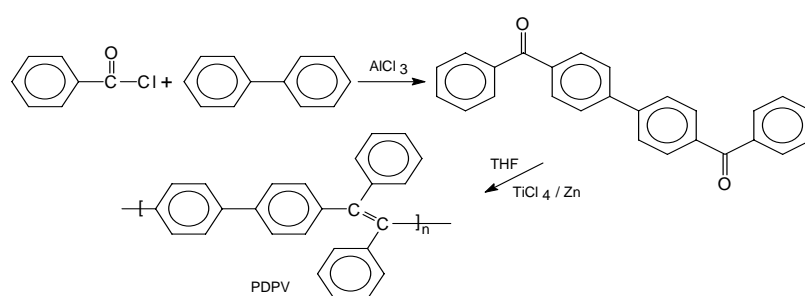


FIGURE 1 The synthesis route of the PDPV

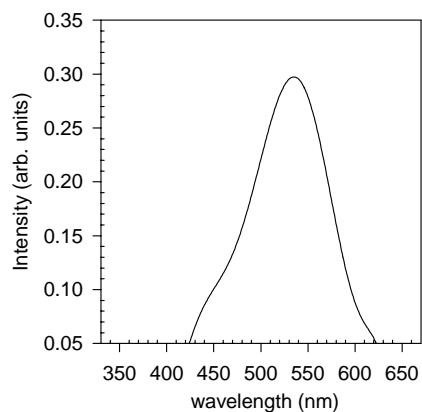


FIGURE 2 Normalized emission spectrum of the device

Voltametri Stripping Ion Raksa(II) Menggunakan Elektroda Polipirrol/1,10-Dibenzil-1,10-Diaza-18-Crown-6

Muji Harsini¹⁾, Buchari²⁾, Indra Noviandri²⁾, Susanto Imam Rahayu²⁾

¹⁾Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Airlangga, Kampus C-Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia
harsini2002@yahoo.com

²⁾Jurusan Kimia FMIPA ITB, Ganesha 10, Bandung, Indonesia
buchari@chem.itb.ac.id
inov@chem.itb.ac.id
susanto@chem.itb.ac.id

Abstract

A sensitive stripping voltammetry methods of analysis has been developed for determination of mercury at polypyrrole/1,10-Dibenzil-1,10-Diaza-18-Crown-6 electrode. Prepared of electrode by electropolymerization of pyrrole and 1,10-dibenzil-1,10-diaza-18-crown-6 with sodium perchlorate as supporting electrolyte in acetonitril at -700 – 1100 mV vs. Ag/AgCl, with scan rate 80 mV/s on platinum disc. Determination of mercury with this electrode, several parameters were varied, such as deposition potential and concentration of 1,10-Dibenzil-1,10-Diaza-18-Crown-6. The calibration plot was linear in $5.10^{-13} - 5.10^{-12}$ M with r^2 0.9911 and detection limit was $4.92.10^{-13}$ M; the coefficient of variation determination at a concentration 10^{-12} M was 4%. Base on deposition and stripping potential, the reaction at the electrode may be caused by chemical reaction followed electrochemical reaction.

Key words: stripping voltammetry, polypyrrole, 1,10-dibenzil-1,10-diaza-18-crown-6, mercury(II)

1. Pendahuluan

Raksa adalah satu dari bagian terbesar kelimpahan logam berat dalam lingkungan, dan memiliki sifat toksik. Karena berbahaya untuk kesehatan tubuh manusia, penentuan raksa sangat penting untuk melindungi lingkungan. Metoda yang sering digunakan untuk penentuan raksa adalah spektrometri serapan atom (AAS) dan *inductively coupled plasma* (ICP-AES)(Vandecasteelee, 1997), namun metode ini dibutuhkan preparasi sampel dan dibutuhkan biaya mahal. Metode yang sedang berkembang adalah elektrometri, yaitu elektroda selektif ion (ESI) menggunakan senyawa makrosiklis crown eter (Buhlma, 1998) dan kaliks arena (Mahajan, 2004), voltametri (Huang, 2002) dan amperometri (Majid, 2002). Secara alami, raksa ada dalam lingkungan. Dalam air laut, kandungan raksa adalah 3.10^{-5} ppm (Cantle, 1982) sehingga perlu dipelajari penentuannya dengan metode

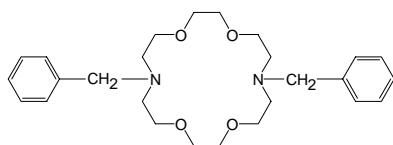
yang mempunyai sensitivitas dan selektivitas tinggi.

Voltametri stripping adalah salah satu keunggulan pada teknik elektroanalitik untuk pengukuran ion logam pada tingkat runtu (Wang, 2001). Sensitivitas yang sangat luar biasa ini akibat dari kombinasi tahap pemekatan yang efektif, karena logam dipekatan pada elektroda kerja dengan faktor 100-1000, sehingga limit deteksinya menjadi lebih rendah 2-3 tingkat dibandingkan dengan voltametri biasa. Pada dasarnya, analisis stripping merupakan teknik yang memiliki dua tahap. Pertama adalah tahap deposisi pada potensial tertentu dimana sebagian kecil ion logam dalam larutan akan terdeposisi pada permukaan elektroda kerja untuk pemekatan. Kemudian diikuti tahap kedua yaitu tahap stripping (tahap pengukuran), melibatkan pelarutan (stripping) dari deposit (Wang, 2000).

Pemilihan elektroda kerja yang tepat adalah

sangat penting untuk berhasil dalam operasi stripping. Elektroda yang biasa digunakan dalam voltametri adalah raksa, karbon, platina, dan emas. Namun dengan perkembangan baru untuk meningkatkan sensitivitas dan selektivitas, digunakan modifikasi elektroda. Salah satu modifikasi elektroda adalah dengan melapiskan polipirol pada permukaan elektroda melalui elektropolimerisasi pirol *in situ*. Polipirol merupakan polimer konduktif yang memiliki sifat kurang selektif karena tidak memiliki sisi aktif spesifik pada permukaan polimernya (Volf, 2002). Oleh karena itu perlu dikembangkan komposit dari polimer konduktif tersebut.

Penelitian ini bertujuan mempelajari elektroda polipirol/1,10-dibenzil-1,10-diaza-18-crown-6 (PPy/DBA₂18C6) sebagai sensor pada pengukuran Hg²⁺ secara voltametri stripping pulsa diferensial. Dengan mengasumsikan bahwa senyawa DBA₂18C6 memiliki kemampuan yang sama dengan senyawa 1,10-diaza-18-crown-6, $K_{stab} Hg^{2+} 10^{17,9}$ (Gokel, 1995), maka elektroda PPy/DBA₂18C6 dapat merespon ion Hg²⁺ secara sensitif dan selektif.



1,10-dibenzil-1,10-diaza-18-crown-6

2. Percobaan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: pirol (Sigma), 1,10-dibenzil-1,10-diaza-18-crown-6 (Fluka), asetonitril (Ajax), natrium perklorat (E-Merck). Semua bahan berderajat pro analisis tanpa pemurnian lebih lanjut.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat alat elektrolisis serta peralatan gelas yang lazim digunakan di laboratorium kimia analitik. Alat elektrolisis terdiri dari sel dengan tiga buah elektroda yaitu elektroda kerja cakram platina (Pt *disc*) diameter 1,3 mm (luas area 1,3273 mm²) elektroda pembanding Ag/AgCl KCl 3M dan elektroda bantu kawat platina diameter 0,04 mm. Sel elektrokimia ini dihubungkan dengan potensiostat PowerLabs/400 dari ADInstruments yang dihubungkan dengan seperangkat komputer untuk menjalankan *software* Echem Versi 1.52

sehingga voltammogram terbentuk pada *output* dari komputer.

Pembuatan elektroda dilakukan dengan teknik voltametri siklis pada potensial pindai -700-1100mV dengan laju 80 mV/detik. Elektropolimerisasi dilakukan terhadap larutan pirol 0,1M mengandung 18C6 dengan elektrolit pendukung NaClO₄ 0,1M dalam pelarut asetonitril (Harsini, 2004).

Uji elektrode PPy/DBA₂18C6 dengan teknik voltametri pulsa diferensial. Pada percobaan ini digunakan film PPy/DBA₂18C6 pada kawat cakram platina diameter 1,3 mm sebagai elektroda kerja. Pengukuran larutan uji Hg²⁺ dengan elektrolit pendukung KNO₃0,1M+HNO₃ 0,1M dalam pelarut akuadem.

3. Hasil dan Pembahasan

Penentuan potensial deposisi

Untuk membuktikan bahwa pada saat deposisi terjadi reaksi kimia, maka elektrodeposisi ditentukan pada potensial 850, 800, 750 dan 700 mV yang dimaksudkan untuk mempertahankan raksa dengan muatan +2. Dengan demikian ion Hg²⁺ akan terdeposisi pada permukaan elektroda dalam bentuk kompleksnya dengan senyawa DBA₂18C6. Dalam penelitian ini, juga dilakukan elektrodeposisi pada potensial -1000 mV yang diharapkan semua ion Hg²⁺ tereduksi membentuk Hg⁰. Pengukuran arus dilakukan pada saat stripping, yaitu lepasnya ion Hg²⁺ dari permukaan elektroda. Kurva hubungan antara potensial deposisi dan arus yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan voltammogram dapat dilihat bahwa potensial yang memberikan arus tertinggi adalah +800 mV. Sedangkan pada potensial deposisi -1000 mV tidak memberikan arus puncak. Hal ini menunjukkan bahwa Hg²⁺ telah tereduksi menjadi Hg⁰ sehingga tidak terdeposisi pada permukaan elektroda.

Pada penelitian ini dilakukan juga pengukuran larutan Hg²⁺ menggunakan elektroda polipirol, yang ternyata tidak memberikan arus puncak (Gambar 2). Hal ini disebabkan film polipirol cenderung bermuatan positif, ada tolakan ion Hg²⁺ yang bermuatan sama, sehingga Hg²⁺ tidak dapat terdeposisi pada permukaan elektroda. Demikian juga pengukuran terhadap larutan KNO₃ 0,1M +HNO₃ 0,1N sebagai elektrolit pendukung tidak memberikan arus

puncak, hal ini menandakan bahwa elektroda tidak memberikan reaksi pada elektrolit pendukung, sehingga arus puncak yang ditimbulkan hanya berasal dari ion Hg^{2+} dalam larutan (Gambar 3).

Penentuan konsentrasi optimum $\text{DBA}_218\text{C6}$

Pada pembuatan elektroda dilakukan pula penentuan konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$ yang digunakan pada elektropolimerisasi PPy/ $\text{DBA}_218\text{C6}$. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$ yang memberikan arus paling besar pada penentuan larutan Hg^{2+} . Pada penelitian ini konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$ adalah 0,025; 0,040; 0,050 dan 0,100% dalam larutan pirol 0,1M dengan pelarut asetonitril. Kurva hubungan antara konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$ dan arus yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 7. Berdasarkan kurva pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$, semakin besar pula arus yang dihasilkan, namun pada konsentrasi 0,100% memberikan hasil yang hampir sama dengan konsentrasi 0,050%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah $\text{DBA}_218\text{C6}$ yang terjebak dalam polipirrol pada permukaan elektroda jumlahnya telah mencapai maksimum. Dengan demikian konsentrasi $\text{DBA}_218\text{C6}$ optimum pada pembuatan elektroda PPy/ $\text{DBA}_218\text{C6}$ adalah 0,050%.

Kurva hubungan konsentrasi dan arus

Uji elektroda PPy/ $\text{DBA}_218\text{C6}$ dilakukan pada pengukuran ion Hg^{2+} dengan konsentrasi 10^{-13} – 10^{-11} M dengan elektrolit pendukung KNO_3 0,1M+ HNO_3 0,1M pada potensial deposisi +800 mV, selama 30 detik, kurva linier yang diperoleh adalah pada konsentrasi 5.10^{-13} – 5.10^{-12} M dengan koefisien korelasi r^2 0,9911.

Limit deteksi

Untuk menentukan limit deteksi, dilakukan pengukuran arus larutan blanko HNO_3 0,1M + KNO_3 0,1M beberapa kali kemudian dihitung simpangan bakunya (S_B). Limit deteksi adalah $3S_B/\text{kemiringan persamaan regresi kurva kalibrasi}$. Persamaan kurva kalibrasi pada Gambar 5 adalah $y = 1,6711.10^{-13}x + 85.347$, sedangkan simpangan baku sebanyak lima kali pengukuran adalah 2,74, sehingga limit deteksi adalah $3 \times 2,74 / 1,6711.10^{-13}x = 4,92.10^{-13}$ M. Dengan teknik yang sama, limit deteksi yang dihasilkan dari penelitian ini jauh lebih kecil dari limit deteksi penelitian Huang 5.10^{-10} M yang menggunakan ditizon pada elektrode *glassy carbon* modifikasi (Huang, 2002).

Kebolehlulangan

Dilakukan dengan mengukur larutan Hg^{2+} 10^{-12} M beberapa kali, kemudian dihitung simpangan baku (S_B) dan koefisien variansi (KV). Hasil perhitungan menunjukkan simpangan baku dengan lima kali pengukuran adalah 2,80 dan koefisien variansi 4%.

Perolehan kembali

Pengukuran dilakukan terhadap larutan sampel yang dibuat sendiri dengan konsentrasi tertentu, kemudian arus yang dihasilkan diekstrapolasi pada persamaan kurva kalibrasi. Pengukuran terhadap larutan sampel menunjukkan hasil yang lebih besar daripada konsentrasi yang sesungguhnya (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian ion Hg^{2+} masih terdapat pada permukaan elektroda, tidak terstriping semua pada pengukuran sebelumnya, yang menunjukkan kuatnya ikatan antara $\text{Hg-DBA}_218\text{C6}$ pada permukaan elektroda

Tabel 1. Hasil pengukuran larutan sampel dengan metode kurva kalibrasi

Konsentrasi sesungguhnya (M)	Perolehan kembali (M)
20.10^{-13}	$22,50.10^{-13}$
30.10^{-13}	$34,38.10^{-13}$

Mekanisme Reaksi pada Permukaan Elektroda

Dengan menggunakan kurva hubungan antara potensial deposisi terhadap arus yang dihasilkan pada penentuan potensial deposisi (Gambar 1), dapat dilihat bahwa potensial deposisi yang memberikan arus paling tinggi adalah +800 mV. Pada potensial yang lebih rendah sebagian Hg^{2+} telah tereduksi menjadi Hg_2^{2+} dan Hg^0 sehingga kemampuannya untuk bereaksi pada permukaan elektroda rendah (sedikit). Demikian juga pada potensial yang lebih besar, muatan elektroda menjadi lebih positif sehingga terjadi tolakan elektrostatis terhadap ion Hg^{2+} , ion logam yang telah mencapai permukaan elektroda hanya sedikit. Dengan demikian terjadinya deposisi pada permukaan elektroda disebabkan oleh reaksi kimia, yaitu pembentukan kompleks Ppy/ $\text{DBA}_218\text{C6-Hg}^{2+}$. Selanjutnya dilakukan proses striping pada potensial -1000 – 0 mV, arus puncak striping Hg^{2+} tertinggi adalah pada potensial -330mV. Ini menunjukkan bahwa ion Hg^{2+} dilepas dari permukaan elektroda pada potensial rendah, transfer elektron dari permukaan elektroda terjadi pada proses ini,

sehingga kompleks PPy-/DBA₂18C6-Hg²⁺ berubah menjadi PPy/DBA₂18C6-Hg⁰ dan selanjutnya distripping dari permukaan elektroda masuk ke dalam larutan dalam bentuk ion Hg²⁺. Hal ini terjadi karena selusur dilakukan ke arah oksidasi, dari -1000 sampai 0 mV. Hasilnya akan berbeda jika dilakukan selusur ke arah reduksi yang memberikan arus puncak lebih pendek (Gambar 6).

Usulan mekanisme reaksi pada permukaan elektroda adalah sebagai berikut:

Proses deposisi

Hg²⁺_{larutan} + Ppy/DBA₂18C6_{permukaan elektroda}

→ Ppy/DBA₂18C6-Hg²⁺_{adsorpsi}

Proses stripping

Ppy/DBA₂18C6-Hg²⁺_{adsorpsi} + 2e-

→ Ppy/DBA₂18C6-Hg⁰_{adsorpsi} → Hg²⁺_{larutan} + 2e- +

Ppy/DBA₂18C6_{permukaan elektroda}

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa elektroda PPy/DBA₂18C6 mempunyai sensitivitas tinggi, mampu mendeteksi ion Hg²⁺ secara voltametri pulsa diferensial dengan limit deteksi 4,92.10⁻¹³ M pada potensial deposisi +800 mV selama 30 detik

5. Pustaka

Buhlmaa, P., Pretsch, E., Bakker, E., 1998, Carrier-based Ion Selective Electrodes and Bulk Optodes (2). Ionophores for Potentiometric and Optical Sensor, *Chem. Review*, **98**, 1593-1687

Cantle, J.E., 1982, Atomic Absorption Spectrometry, Elsevier Scientific Publishing Co.

Gokel, G.W. (editor), 1995, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol 1, Pergamon.

Harsini, M., Buchari, Indra Noviandri, dan Susanto Imam Rahayu, 2004, Elektropolimerisasi Film Komposit Polipirol/1,10-Dibenzil-1,10-Diaza-18-Crown-6 secara Voltametri Siklis, *Proceeding Seminar MIPA IV ITB*, 6-7 Oktober, ISBN 979-368-02-5, 68-71.

Huang, W., and Shenghui Z., 2002, Determination of Mercury at a Dithizone-Modified Glassy Carbon Electrode by Anodic Stripping Voltammetry, *Anal. Sci*, **Februari**, 187-189.

Mahajan, R.K., Ravneet K., Inderpreet K., Vandana S, Manoj K., 2004, Mercury(II) Ion-Selective Electrodes Based on *p-tert*-Butyl Calix[4]Crowns with Imine Units, *Anal. Sci*, **May**, **20**, 811-814.

Majid, S., Mama E.R., Aziz A., Christopher M.A.B., 2002, An Amperometric Method for the Determination of Trace Mercury(II) by Formation of Complexes with L-Tyrosine, *An.Chim.Acta*, **464**, 123-133

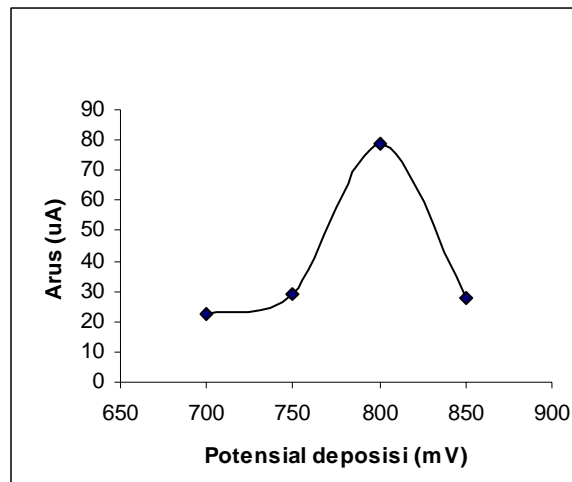
Vandecasteelee, C., and Bloc, C.B., 1997, *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley and Sons, New York

Volf, R., et al, 2002, Preparation, Characterization and Analytical Application of Elektropolymerized Film, *Solid State Ionics* **154-155**, 57-63

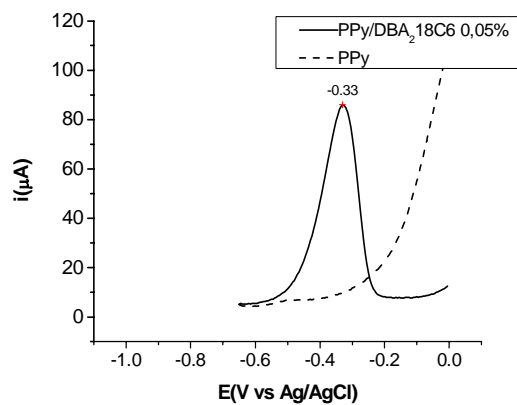
Wang, J., 2000, *Analytical Electrochemistry*, 2nd Ed., Wiley-VCH, New York

Wang, J., Jianmin Lu, Ulku A.K., Samo B.H, and Bozidar O, 2001, Insignhts into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *An. Chim. Acta*, **434**, 29-34

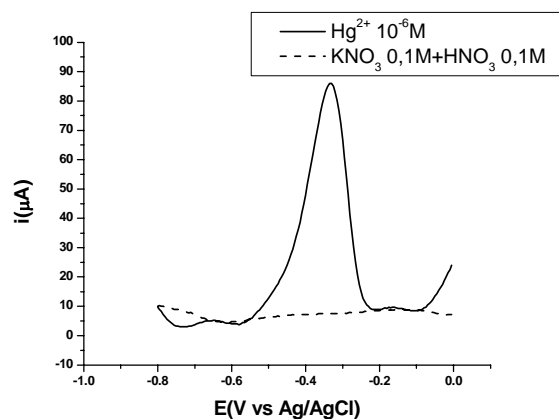
LAMPIRAN



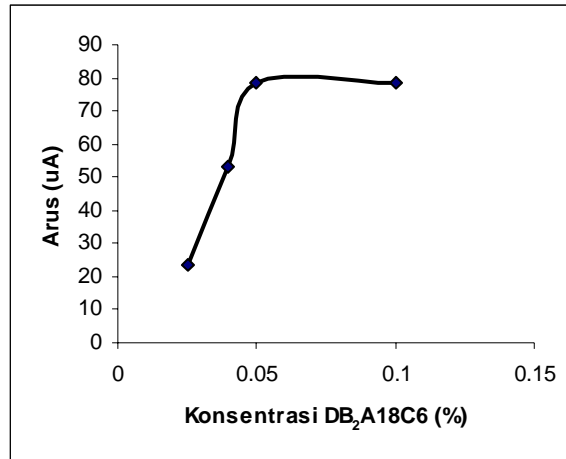
Gambar 1. Kurva hubungan potensial deposisi dengan arus pada pengukuran larutan $Hg^{2+} 10^{-6}M$ dalam HNO_3 0,1M dengan waktu deposisi 240 detik



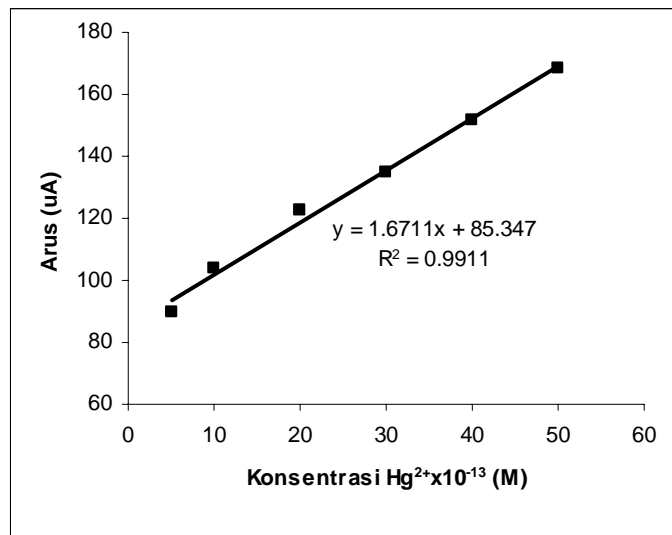
Gambar 2. Voltamogram stripping pulsa diferensial perbandingan antara elektroda komposit PPY/DBA218C6 dengan elektroda polipirol pada pengukuran larutan $Hg^{2+} 10^{-6}M$



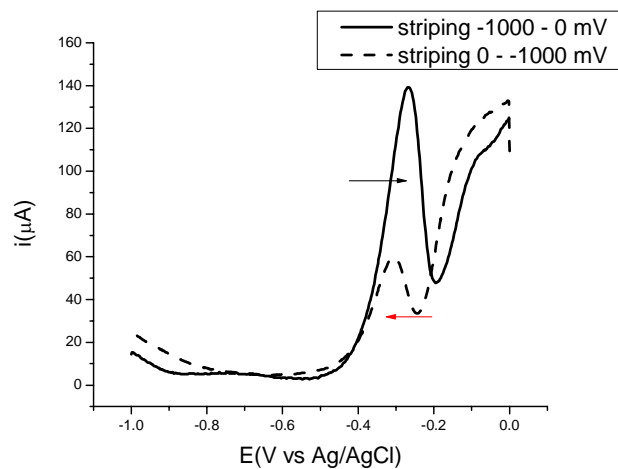
Gambar 3. Voltamogram stripping pulsa diferensial perbandingan penentuan $Hg^{2+} 10^{-6}M$ dan $KNO_3 + HNO_3$ 0,1M dengan elektroda PPY/DBA₂18C6



Gambar 4. Kurva hubungan konsentrasi DBA₂18C6 yang ditambahkan dengan arus yang dihasilkan dari voltamogram stripping pulsa diferensial pada pengukuran larutan Hg²⁺ 10⁻⁶M



Gambar 5. Kurva hubungan konsentrasi Hg²⁺ 5.10⁻¹³-5.10⁻¹²M dan arus, waktu deposisi 30 detik



Gambar 6. Pengaruh potensial selusur awal

Vatikanol A dan α -Viniferin, Trimer resveratrol dari ekstrak aseton kulit batang *DIPTEROCARPUS RETUSUS* Blume

Muhtadi,¹⁾ Euis H. Hakim,²⁾ Yana M. Syah,²⁾ Lia D. Juliawaty,²⁾ Lukman Makmur,²⁾
Sjamsul A. Achmad,²⁾ Ikram M. Said,³⁾ Laily B Din³⁾ dan Jalifah Latip³⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jalan A. Yani Tromol Pos I Pabelan Kartasura, Surakarta 57102, Indonesia

²⁾ Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10 Bandung 40132, Indonesia E-mail: euis@chem.itb.ac.id

³⁾ School of Chemical Sciences & Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E., Malaysia

Abstrak

Dua trimer resveratrol, vatikanol A dan α -viniferin, telah diisolasi untuk pertama kalinya dari ekstrak aseton kulit batang *Dipterocarpus retusus* Blume. Struktur molekul kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR serta perbandingan dengan data sejenis yang telah dilaporkan. Vatikanol A dan α -viniferin menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 27,0 dan 17,5 μ g/ml.

Kata kunci : *Dipterocarpaceae*, trimer resveratrol, vatikanol A, α -viniferin, dan *Dipterocarpus retusus* Blume

1. Pendahuluan

Dipterocarpus atau “keruing” dilaporkan sekurang-kurangnya memiliki 75 spesies dan merupakan genus terbesar ketiga dari 16 genus dalam famili tumbuhan Dipterocarpaceae (Ashton, 1983). Secara fitokimia, kelompok tumbuhan ini dikenal sebagai salah satu famili tumbuhan penghasil senyawa turunan fenol, terutama dari golongan oligomer resveratrol (Sotheeswaran, 1993; Hakim, 2002). Berdasarkan kajian fitokimia dari sekitar 15 spesies *Dipterocarpus* yang telah diteliti, tidak kurang dari 27 senyawa terpenoid serta 14 senyawa fenolik yang telah dilaporkan dari spesies *D. grandiflorus* (Ito, 2004). Tumbuhan *Dipterocarpus* tersebar luas dari Srilanka, India, Birma, Thailand, Cina bagian selatan, Filipina, Malaysia dan Indonesia (Kartawinata, 1983). Salah satu spesies keruing yaitu *D. retusus*, adalah endemik di pulau Kalimantan dan Sumatera. Dalam makalah ini akan

disampaikan penemuan vatikanol A dan α -viniferin dari ekstrak aseton kulit batang tumbuhan ini dan sifat sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388. Struktur molekul kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR serta perbandingan dengan data sejenis yang telah dilaporkan. Sedangkan sitotoksitasnya ditentukan dengan menggunakan sel murin leukemia P-388.

2. Percobaan

Umum. Titik leleh ditentukan dengan ‘micro melting point apparatus’. Putaran optik diukur dengan polarimeter Perkin-Elmer 341 dalam MeOH. Spektrum UV dan IR ditetapkan dengan Cary Varian 100 Conc. dan Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometers. Spektrum ¹H dan ¹³C-NMR ditentukan dengan spektrofotometer JEOL ECP400, yang beroperasi pada 400 MHz (¹H) dan 100 MHz (¹³C). Kromatografi cair

vakum menggunakan Si-gel 60 GF₂₅₄ (Merck), kromatografi radial menggunakan Si-gel 60 PF₂₅₄ (Merck), dan analisis KLT menggunakan plat KLT Kieselgel 60 GF₂₅₄ 0,25 mm (Merck). Pelarut yang digunakan semuanya berkualitas teknis yang didestilasi.

Bahan. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah kulit batang *D. retusus* Blume, diperoleh dari Hutan Percobaan Cifort - Darmaga Bogor Jawa Barat, pada bulan September 2003. Tumbuhan tersebut diidentifikasi oleh staf Herbarium Bogoriensis, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor.

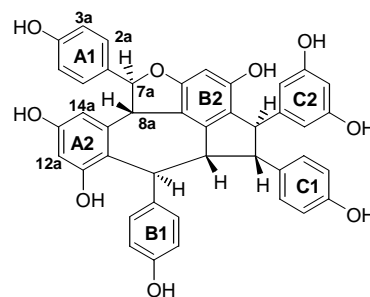
Ekstraksi dan Isolasi. Tiga kilogram serbuk kering kulit batang *D. retusus* Blume diekstraksi dengan aseton. Ekstrak aseton selanjutnya dipekatkan pada tekanan rendah dan diperoleh gum berwarna coklat gelap (131 g). Ekstrak aseton tersebut, selanjutnya dilarutkan kembali dalam campuran MeOH-dietileter sehingga menghasilkan fraksi terlarut MeOH-dietileter, juga berupa gum berwarna coklat gelap (106 g). Fraksi MeOH-dietileter kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom cair (KVC) [adsorben Si-gel, eluen campuran heksan-etilasetat (7:3 - etilasetat 100%, MeOH 100%)] menghasilkan 5 fraksi utama A-E (masing-masing 1,0; 2,2; 3,3; 2,0; dan 6,2 g). Fraksi C (3,3 g) selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (kcv) (adsorben Si-gel; eluen yang digunakan mulai heksana:etilasetat = 6:4 – etilasetat:MeOH = 8:2) diperoleh 4 fraksi C₁-C₄ berturut-turut (867mg; 371 mg; 380 mg; dan 521 mg). Terhadap fraksi C₁ (867 mg) selanjutnya dilakukan fraksinasi dan pemurnian dengan metode kromatografi radial (kr) (Si-gel, CHCl₃:MeOH = 9:1) diperoleh (-)-vaticanol A (**1**) (40 mg). Sedangkan dari fraksi C₂ (371 mg) setelah dilakukan fraksinasi dan pemurnian dengan metode kromatografi radial (kr) (Si-gel, CHCl₃:MeOH = 9,5:0,5) diperoleh (-)- α -viniferin (**2**) (112 mg). Sifat sitotoksitas terhadap sel murin leukemia P-388 kedua senyawa tersebut ditentukan dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh NCI (Hostettmann, 1991).

3. Hasil dan Pembahasan

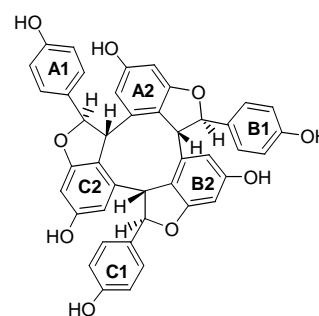
Hasil Penelitian. Senyawa **1**, diperoleh berupa padatan berwarna putih kecoklatan dengan t.l.

248 °C (terurai) dan $[\alpha]_D^{20}$ -130° (c 0,1 MeOH). Spektrum UV (MeOH) λ_{maks} (log ϵ) 227 (4,64), dan 284 nm (3,98). Spektrum IR (KBr) ν_{maks} 3550 – 3231 cm⁻¹ (gugus -OH), 1614, 1511, dan 1454 cm⁻¹ (C=C benzena), dan 828 cm⁻¹ (*p*-disubstitusibenzena). Spektrum ¹H dan ¹³C NMR dalam Tabel 1.

Senyawa 2, diperoleh berupa padatan berwarna putih kecoklatan dengan t.l. 235 °C (terurai) dan $[\alpha]_D^{20}$ -50° (c 0,1 MeOH). Spektrum UV (MeOH) λ_{maks} (log ϵ) 229 (4,57), dan 286 nm (4,19). Spektrum IR (KBr) ν_{maks} 3456-3231 cm⁻¹ (gugus-OH), 1614, 1515, dan 1486 cm⁻¹ (C=C benzena), dan 829 cm⁻¹ (*p*-disubstitusibenzena). Spektrum ¹H dan ¹³C NMR dalam Tabel 2.



1



2

Pembahasan. Senyawa **1** diperoleh berupa padatan berwarna putih kecoklatan dengan t.l. 248 °C (terurai) dan $[\alpha]_D^{20}$ -130° (c 0,1 MeOH). Senyawa **1** adalah oligomer resveratrol berdasarkan data spektrum UV dan spektrum IR. Spektrum UV senyawa **1** memperlihatkan serapan maksimum pada λ_{maks} 227 dan 284 nm, yang mengalami pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser NaOH, merupakan ciri khas dari senyawa fenolik. Sementara itu spektrum IR senyawa **1** menunjukkan adanya gugus hidroksil (ν_{maks} 3550 – 3231 cm⁻¹), aromatik (1616, 1511, dan 1483 cm⁻¹) dan *p*-

Tabel 1. Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR **senyawa 1** dan (-)-vatikanol A standar (1*)

No. C	^1H NMR		^{13}C NMR	
	1	1*	1	1*
1a	-	-	134,5	134,4
2/6a	7,26 (<i>d</i> , J=8,8)	7,28 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	128,0	128,0
3/5a	6,81 (<i>d</i> , J=8,8)	6,83 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	116,1	116,0
4a	-	-	157,9	157,9
7a	6,16 (<i>brd</i> , J=4,0)	6,18 (<i>brd</i> , J=3,9, 1H)	86,6	86,5
8a	4,49 (<i>d</i> , J=4,0)	4,51 (<i>d</i> , J=3,9, 1H)	50,4	50,3
9a	-	-	144,8	144,7
10a	-	-	119,4	119,3
11a	-	-	157,8	157,7
12a	6,06 (<i>d</i> , J=2,2)	6,10 (<i>d</i> , J=2,4, 1H)	101,4	101,3
13a	-	-	156,4	156,3
14a	6,46 (<i>d</i> , J=2,2)	6,48 (<i>d</i> , J=2,4, 1H)	103,3	103,3
1b	-	-	138,7	138,7
2/6b	7,04 (<i>d</i> , J=8,4)	7,07 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	129,3	129,2
3/5b	6,59 (<i>d</i> , J=8,4)	6,60 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	114,8	115,4
4b	-	-	155,8	155,8
7b	5,15 (<i>br s</i>)	5,17 (<i>br s</i> , 1H)	36,1	36,0
8b	4,49 (<i>d</i> , J=7,0)	4,52 (<i>d</i> , J=7,3, 1H)	48,7	48,6
9b	-	-	144,9	144,9
10b	-	-	118,7	118,6
11b	-	-	159,7	159,9
12b	6,21 (<i>s</i>)	6,22 (<i>s</i> , 1H)	95,4	95,3
13b	-	-	155,5	155,4
14b	-	-	122,3	122,2
1c	-	-	135,8	135,8
2/6c	6,52 (<i>d</i> , J=8,4)	6,55 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	129,7	129,6
3/5c	6,34 (<i>d</i> , J=8,4)	6,37 (<i>d</i> , J=8,8, 2H)	114,9	114,9
4c	-	-	156,5	156,4
7c	3,62 (<i>d</i> , J=7,0)	3,65 (<i>d</i> , J=7,0, 1H)	64,4	64,3
8c	4,17 (<i>br s</i>)	4,20 (<i>br s</i> , 1H)	57,5	57,5
9c	-	-	147,6	147,5
10c	6,25 (<i>d</i> , J=2,2)	6,27 (<i>d</i> , J=2,0, 1H)	106,7	106,7
11c	-	-	159,4	159,2
12c	6,19 (<i>t</i> , J=2,2)	6,21 (<i>d</i> , J=2,0, 1H)	101,3	101,3
13c	-	-	159,4	159,2
14c	6,28 (<i>d</i> , J=2,0 1H)	6,27 (<i>d</i> , J=2,0, 1H)	106,7	106,7

* Tanaka, 2000.

disubstitusibenzena (828 cm^{-1}) yang merupakan ciri khas oligomer resveratrol yang telah memodifikasi kerangka stilben. Pembuktian lebih lanjut berkenaan dengan **struktur 1** dilakukan melalui analisis data spektroskopi 1D (^1H dan ^{13}C NMR). Spektrum ^{13}C NMR **senyawa 1** (Tabel 1) memperlihatkan 34 sinyal yang mewakili 42 C, yang terdiri dari 28 C-aromatik 8 diantaranya C-oksiril, dan 6 C-alifatik. Data ^{13}C NMR tersebut membuktikan bahwa **senyawa 1** adalah trimer resveratrol. Selanjutnya spektrum ^1H NMR **senyawa 1**

(Tabel 1) memperlihatkan sejumlah sinyal aromatik yang sesuai dengan adanya tiga unit *p*-hidroksifenil (δ_{H} 7,25 dan 6,81 ppm (*d*, J=8,8 Hz, 2H); 7,04 dan 6,59 ppm (*d*, J=8,4 Hz, 2H); 6,52 dan 6,34 (*d*, J=8,4 Hz, 2H) ppm), satu unit 3,5-dihidroksifenil (δ_{H} 6,19 (*t*, 1H) dan 6,25 ppm (*d*, J=2,2 Hz, 2H), satu pasang proton kopling *meta* unit 1,2,3,5-tetrasubstitusibenzen (δ_{H} 6,06 dan 6,46 ppm (*d*, J=2,2 Hz) dan satu proton aromatik untuk unit pentasubstitusibenzen (δ_{H} 6,21 ppm (*s*)). Selain itu, spektrum ^1H NMR juga menunjukkan

Tabel 2. Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR senyawa **2** dan (-)- α -viniferin standar (2*)

No. C	^1H NMR		^{13}C NMR	
	2	2*	2	2*
1a	-	-	132,0	132,0
2/6a	7,01 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	7,03 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	128,2	128,1
3/5a	6,70 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	6,72 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	115,7	115,7
4a	-	-	158,2	157,8
7a	6,07 (<i>br s</i> , 1H)	6,21 (<i>br s</i>)	86,4	86,4
8a	3,95 (<i>br s</i> , 1H)	3,98 (<i>br s</i>)	46,4	46,4
9a	-	-	141,2	141,2
10a	-	-	120,9	120,9
11a	-	-	160,6	161,6
12a	6,22 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	6,25 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	98,0	98,0
13a	-	-	159,3	159,3
14a	6,71 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	6,72 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	106,2	106,2
1b	-	-	132,5	132,5
2/6b	7,02 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	7,08 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	128,7	128,6
3/5b	6,78 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	6,79 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	116,1	116,1
4b	-	-	158,4	158,3
7b	4,90 (<i>d</i> , J=6,2 Hz, 1H)	4,90 (<i>d</i> , J=6,4 Hz, 1H)	95,6	95,6
8b	4,60 (<i>d</i> , J=6,2 Hz, 1H)	4,61 (<i>d</i> , J=6,4 Hz, 1H)	55,7	55,6
9b	-	-	141,2	141,2
10b	-	-	118,8	118,8
11b	-	-	161,6	161,6
12b	6,24 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, 1H)	6,22 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	98,0	98,0
13b	-	-	159,3	159,3
14b	5,98 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, 1H)	5,99 (<i>d</i> , J=1,8 Hz, 1H)	108,6	108,5
1c	-	-	132,0	132,0
2/6c	7,22 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	7,22 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	128,1	128,1
3/5c	6,76 (<i>d</i> , J=8,8 Hz, 2H)	6,77 (<i>d</i> , J=8,5 Hz, 2H)	116,1	116,2
4c	-	-	157,9	157,8
7c	5,92 (<i>d</i> , J=10,0 Hz, 1H)	5,95 (<i>d</i> , J=9,7 Hz, 1H)	90,0	90,0
8c	4,68 (<i>d</i> , J=10,0 Hz, 1H)	4,71 (<i>d</i> , J=9,7 Hz, 1H)	52,8	52,8
9c	-	-	138,7	138,7
10c	-	-	119,7	119,7
11c	-	-	161,7	161,7
12c	6,20 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, 1H)	6,15 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, 1H)	96,9	96,9
13c	-	-	160,7	160,8
14c	6,59 (<i>d</i> , J= 2,0 Hz, 1H)	6,46 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, 1H)	105,8	105,8
OH	8,85;8,76;8,70;8,63;8,61; 8,57 (masing-masing <i>brs</i> , 1H)			
UV **)	229 (4,57), 286 (4,19)	225 (4,68), 286 (3,92)		
IR cm^{-1} **)	3456-3231, 1617, 1512, 1486, 829	3387, 1616, 1515, 1485, 831		
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ **)	-50°	-58°		

* Pryce, 1977. (pelarut yang digunakan aseton- d_6)

**Data dibandingkan dengan data (-)- α -viniferin dari *S. seminis* (Aminah, 2002)

adanya enam sinyal proton alifatik, dua diantaranya khas untuk 2,3-disubstitusi-2,3-dihidrobenzofuran (δ_{H} 6,16 dan 4,49 ppm (*d*, J=4,0 Hz)), sedangkan empat sinyal lainnya sesuai dengan unit 1,1,2,3,4,4-heksasubstitusibutana (δ_{H} 5,15, 4,49, 3,62, dan 4,17 ppm). Berdasarkan unit-unit struktur

tersebut, maka dapat dirumuskan struktur senyawa ini, dimana berdasarkan penelusuran pustaka telah ditemukan sebelumnya sebagai (-)-vatikanol A. Perbandingan data NMR (Tabel 1) **senyawa 1** dengan (-)-vatikanol A standar memperlihatkan kesesuaian yang tinggi.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa **senyawa 1** adalah **(-)-Vatikanol A**.

Dengan metodologi penentuan struktur yang sama, dapat juga ditentukan bahwa **senyawa 2** adalah **(-)- α -viniferin**.

Tabel 2 memperlihatkan data NMR **senyawa 2** dan **(-)- α -viniferin** standar yang telah dilaporkan oleh Pryce, 1977.

Hasil pengukuran sifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 menunjukkan bahwa **(-)- α -viniferin** memiliki IC_{50} 17,5 μ g/ml lebih aktif daripada **(-)-vatikanol A** dengan nilai IC_{50} 27,0 μ g/ml. Nilai IC_{50} diatas 4 μ g/ml menunjukkan kedua senyawa trimer resveratrol ini kurang sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 (Hostettmann, 1991).

Makna penemuan (-)-vatikanol A dan (-)- α -viniferin terhadap aspek kemo-taksonomi

Dipterocarpus

Berdasar penelusuran pustaka, penemuan **(-)-vatikanol A** dalam genus *Dipterocarpus* merupakan yang pertama kali dilaporkan. Senyawa ini juga pernah ditemukan sebelumnya pada *S. selanica* (Tukiran, 2003), *V. rassak* (Tanaka, 2000) dan *V. pauciflora* (Ito, 2003). Keberadaan senyawa ini, memberikan pengetahuan tentang kedekatan hubungan genus *Dipterocarpus*, *Shorea* dan *Vatica* berdasar kajian fitokimia. Hal ini mendukung kedekatan hubungan ketiga genus ini pada Dipterocarpaceae yang telah digaribawahi oleh peneliti taksonomi Biologi (Ashton, 1983). Sedangkan senyawa α -viniferin ditemui hampir pada semua spesies tumbuhan famili Dipterocarpaceae yang telah dikaji aspek fitokimianya. Hal ini memperkuat dugaan bahwa α -viniferin merupakan 'chemical marker' dari famili Dipterocarpaceae.

4. Kesimpulan

Dua timer resveratrol telah berhasil diisolasi dari ekstrak aseton kulit batang *D. retusus* Blume, yaitu **(-)-vatikanol A** (1) dan **(-)- α -viniferin** (2). Sifat sitotoksik α -viniferin (IC_{50} 17,5 μ g/ml) lebih tinggi dari vatikanol A (IC_{50} 27,0 μ g/ml). Senyawa α -viniferin ditemui pada hampir semua spesies dalam famili tumbuhan Dipterocarpaceae. Sedangkan keberadaan vatikanol A dalam genus *Dipterocarpus* memberi arti pada kedekatan hubungan genus

Dipterocarpus dengan genus *Shorea* dan *Vatica*. Walaupun demikian, hipotesis ini perlu mendapat dukungan lebih lanjut dengan melakukan kajian sejenis terhadap spesies-spesies dari *Dipterocarpus*, *Shorea* dan *Vatica*.

5. Uca[an Terimakasih

Kami ucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti Depdiknas atas bantuan beasiswa BPPs, Kebun Percobaan Cifort – Darmaga Bogor atas bantuannya dalam menyediakan sampel tumbuhan dan staf Herbarium Bogoriensis Bogor dalam determinasi tumbuhan. Dr. Jalifah Latip dari Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) atas bimbingannya selama Program Sandwich di UKM dan bantuannya dalam mengukur spektrum 1H -NMR dan ^{13}C -NMR.

6. Daftar Pustakan

Aminah N.S., Achmad S.A., Hakim E.H., Syah Y.M., Ghisalberti E.L., Juliawaty L.D., **(-)- α -Viniferin**, suatu trimer stilbenoid dari kulit batang *Shorea seminis* V.S. (Dipterocarpaceae). Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, 28-29 Mei 2002, Bandung, 117-112.

Ashton P.S., (1983). Dipterocarpaceae, Dalam: *Flora Malesiana*. Series I, Spermatophyta, Martinus Nijhoff, London, **Vol. 9**, 291-326

Hakim E.H., Achmad S.A., Makmur L., Mujahidin D., Syah Y.M., (2000). Review: Phytochemical profile of Annonaceae, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.*, **1**(1), 1-12.

Hostettmann K., (1991). *Assays for bioactivity method in plant biochemistry*. Series editor P. M. Dey dan J. B. Harborne, Academic Press, London, **Vol 6**.

Ito T., Tanaka T., Iinuma M., Nakaya K., Takahashi Y., Sawa R., Murata J., Darnaedi D., (2004). Two new resveratrol (=5-[1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-benzene-1,3-diol) tetramers with a tetrahydrofuran ring from *Dipterocarpus grandiflorus*. *Helvetica Chimica Acta*, **87**, 479-495.

Ito T., Tanaka T., Nakaya K., Iinuma M., (2003). New resveratrol oligomers in the stem bark of *Vatica pauciflora*. *Tetrahedron*, **59**, 5347-5363.

Kartawinata K., (1983). *Jenis-jenis Keruing*. LIPI, Bogor Indonesia, **Vol. 1**.

Pryce R.J., Langcake P., (1977). α -Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, **16**, 1452-1454.

Muhtadi, Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lia D. Juliawaty, Lukman Makmur, Sjamsul A. Achmad, Ikram M. Said, Laily bin Din dan Jalifah Latip

Sotheeswaran S., Pasupati V., (1993). Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry*, **32**, 1083-1092.

Tanaka T., Ito T., Nakaya K., Inuma, M., Riswan, S., (2000). Oligostilbenoids in stem bark of *Vatica rassak*. *Phytochemistry*, **54**, 63-69.

Tukiran, (2003). Senyawa Mikromolekul dari Beberapa Tumbuhan Meranti (Shorea) Indonesia. Disertasi Doktor, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.

Flavonoid Compounds From *SACCOPETALUM HORSFIELDII* BENN (ANNONACEAE)

Mulyadi Tanjung¹, Hery Suwito¹, Alfinda Novi Kristanti¹, Nanik Siti Aminah¹,
Mahmiah¹, Nanik Fauziah¹ dan Unang Supratman²

¹ Departement of Chemistry, University of Airlangga, Surabaya, Indonesia.

² Departement of Chemistry, University of Padjadjaran, Bandung, Indonesia.

Abstract

Three flavonoids, quercetine-3,7-dimethylether (1), quercetine-3,7,4-trimethylether (2) and 3,5,2,3-tetrahydroxy-7,4-dimethoksiflavan (3) have been isolated from the tree bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn. (Annonaceae). The chemical structures of compounds have been determined by spectroscopic UV, IR, MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

1. Pendahuluan

Annonaceae merupakan salah satu famili tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia. Senyawa kimia yang telah dipisahkan dari famili tanaman ini memperlihatkan berbagai aktivitas seperti antioksidan, anti radikal bebas, antitumor, antikanker, inhibitor enzim, insektisida, dan sebagainya. Senyawa tersebut antara lain dari golongan asetogenin, alkaloid, flavonoid, santon dan piron (Tanjung *et.al.*, 2004; Wang *et.al.*, 2002; Hakim *et.al.*, 2001).

Saccopetalum horsfieldii Benn merupakan tumbuhan endemic Indonesia. Nama daerah tumbuhan ini Janglot atau Kalak Kembang (Heyne, 1987).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa flavonoid yang terdapat pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Isolasi dan pemisahan senyawa yang aktif pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* dilakukan sebagaimana lazimnya isolasi senyawa metabolit sekunder. Struktur molekul senyawa fenolik ditentukan dengan metode spektroskopi ultraviolet, inframerah, dan resonansi magnetik inti. Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian sebelumnya (Tanjung *et.al.*, 2004).

2. Percobaan

Umum

Titik leleh ditentukan dengan alat Fisher Johns. Spektrum ultraviolet ditentukan dengan spektrometer Beckman DU 7500, spektrum inframerah ditentukan dengan FTIR Shimadzu 435. Spektrum resonansi magnetik inti diukur dengan Bruker AM 30 yang bekerja pada 400 MHz. Silika gel SiO₂ Merck 7731 dan 7733 digunakan sebagai fasa diam dalam kromatografi kolom dan kromatografi kolom cepat.

Pengumpulan bahan tanaman

Bahan tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn dikumpulkan dan diidentifikasi di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur

Isolasi senyawa flavonoid

Bahan tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn diekstraksi dengan aseton pada suhu kamar dengan cara maserasi. Pelarut diuapkan dengan *rotavapor vacuum* menghasilkan ekstrak aseton, selanjutnya ekstrak aseton dilarutkan dengan methanol-air 10% dan dipartisi dengan n-heksan. Ekstrak methanol-air ditambahkan asam sitrat 5% (pH 3-4) dan diekstraksi dengan etilasetat. Ekstrak etilasetat dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dan kromatografi kolom cepat. menghasilkan tiga senyawa flavonoid yakni kuersetin 3,7-dimetileter (1), kuersetin 3,7,4-trimeteiler (2),

dan 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon.

3. Hasil

Kuersetin 3,7-Dimetileter berwujud kristal jarum berwarna kuning muda dengan titik leleh t.l., 224-226°C. Spektrum UV senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam metanol memberikan λ_{maks} 257 dan 359 nm. Spektrum IR senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam KBr menunjukkan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang ν pada 3204, 1663, 1500-1600 dan 1148 cm^{-1} . Spektrum ¹H-RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam DMSO-d₆ memberi informasi sinyal proton pada pergeseran kimia δ (ppm): 3,80, 3,86, 6,35 (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,68 (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 6,91 (1H, d, J 8,3 Hz, H-5), 7,47 (1H, dd, J 2,2 dan 6,10 Hz, H-6') dan 7,58 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-2'). Spektrum ¹³C-RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter terlihat adanya 17 atom karbon, 55,88(7-OMe), 59,49 (3-OMe), 92,01 (C-8), 97,49 (C-6), 104,98 (C-10), 115,36 (C-5'), 115,50 (C-2'), 120,40 (C-6'), 120,50 (C-1'), 137,65 (C-3), 144,99 (C-2), 148,56 (C-3'), 155,70 (C-4), 155,99 (C-9), 160,93 (C-5), 164,82 (C-7) dan 177,71 ppm (C-4).

Kuersetin 3,7,4'-trimetileter berwujud kristal jarum berwarna kuning muda mempunyai t.l 173-175°C. Spektrum ultraviolet senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam metanol memberikan λ_{maks} 255 dan 348 nm. Efek batokromik dengan pereaksi geser AlCl₃ memberikan pergeseran pada λ_{maks} 270 dan 394 nm sedangkan dengan pereaksi geser NaOAc tidak memberikan pergeseran. Spektrum infra merah senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter dalam KBr menunjukkan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang ν pada 3443, 1641, 1500-1600 dan 1148 cm^{-1} . Spektrum ¹H-RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam DMSO-d₆ memberi informasi sinyal proton pada pergeseran kimia δ (ppm): 3,81(7-OMe) 3,86 (4'-OMe), 3,88 (3-OMe) 6,33 (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,67 (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 7,09 (1H, d, J 7,3 Hz, H-5'), 7,55 (1H, dd, J 1,5 dan 7,3 Hz, H-6') dan 7,55 ppm (1H, d, J 1,3 Hz, H-2'). Spektrum ¹³C-RMI senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter terlihat adanya 18 atom karbon. Sinyal tersebut adalah 55,55 (4'OMe), 55,85 (7-OMe); 59,49 (3-OMe), 92,03 (C-8), 97,51 (C-6), 105,03 (C-10) 111,73

(C-5'), 114,94 (C-2') dan 120,16 (C-6'), 120,04 (C-1'), 137,97 (C-3), 146,15 (C-2), 150,07 (C-3'), 155,31 (C-4'), 156,01 (C-9), 160,69 (C-5), 164,87 (C-7) dan 177,76 ppm (C-4).

3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon

berwujud padat berwarna kuning muda. Spektrum ultraviolet senyawa 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon dalam metanol memberikan λ_{maks} 262 dan 344 nm. Efek batokromik dengan pereaksi geser AlCl₃ memberikan pergeseran pada λ_{maks} 275, 346 dan 395 nm sedangkan dengan pereaksi geser NaOAc memberikan λ_{maks} 260 dan 346 nm. Spektrum ¹H-RMI senyawa 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon dalam piridin-d₅ memberi informasi sinyal proton pada pergeseran kimia δ (ppm): 3,81 (7-OMe), 3,98 (4'-OMe), 6,64 (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,72 (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 7,34 (1H, d, J 8,80 Hz, H-5'), dan 8,22 ppm (1H, d, J 8,76 Hz, H-6'). Spektrum ¹³C-RMI senyawa 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon terlihat adanya 17 atom karbon. Sinyal tersebut adalah 55,91; 59,87; 92,37; 98,27; 106,18; 116,43 (2C); 121,29; 130,86 (2C); 138,61; 156,63; 156,98; 161,78; 162,17; 165,71; dan 178,92 (C-4).

4. Pembahasan

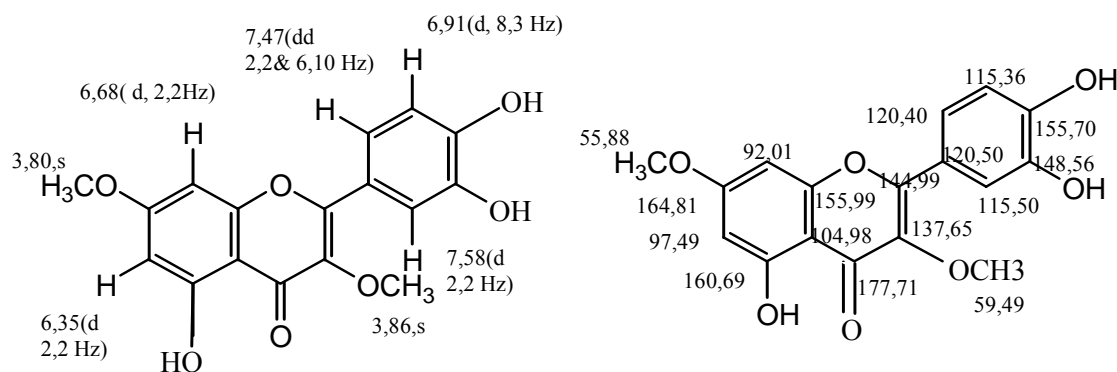
Tiga senyawa fenolik jenis flavonoid telah dipisahkan dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* BENN yang diidentifikasi sebagai kuersetin- 3,7-dimetileter (1), kuersetin- 3,7,4'-trimetileter (2), dan 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon (3).

Kuersetin 3,7-Dimetileter(1) berwujud kristal jarum berwarna kuning muda dengan titik leleh t.l., 224-226°C (Wang, 1989 : 222-225°C). Spektrum UV senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam metanol memberikan λ_{maks} 257 dan 359 nm. Efek batokromik dengan pereaksi geser AlCl₃ memberikan pergeseran yang khas dari senyawa flavonoid yang mempunyai gugus karbonil C=O pada posisi C-3 dan gugus hidroksi OH pada posisi C-5 serta adanya gugus dihidroksi pada posisi C-3' dan C-4' yang membentuk senyawa kompleks dengan logam Al (Harborne, 1982). Spektrum inframerah senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam KBr menunjukkan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang ν pada 3204 cm^{-1} (vibrasi ulur OH), 1663 cm^{-1} (vibrasi ulur

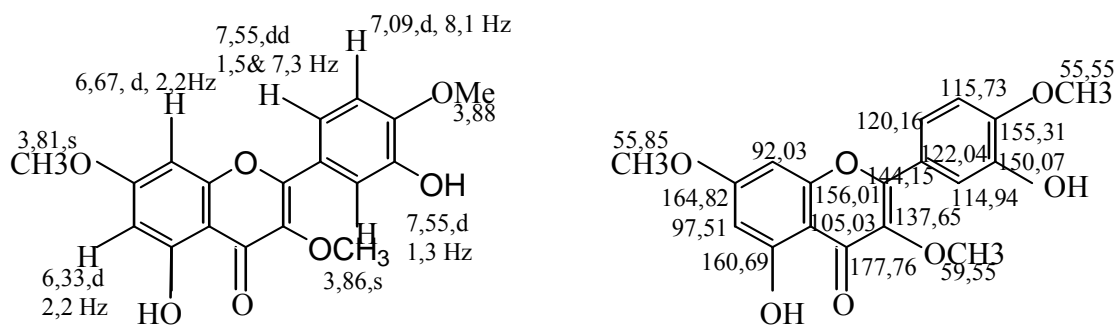
C=O yang terkonyugasi), $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ (vibrasi ulur aromatis) dan 1148 cm^{-1} (vibrasi tekuk C-O-C eter). Spektrum ^1H -RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam DMSO- d_6 memberi informasi adanya 5 proton aromatis dan 2 sinyal gugus metoksi. Sinyal singlet pada 3,80 dan 3,86 ppm merupakan gugus metoksi pada posisi 7-OMe dan 3-OMe. Sinyal proton aromatis terlihat pada pergeseran 6,35 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,68 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 6,91 ppm (1H, d, J 8,3 Hz, H-5'), 7,47 ppm (1H, dd, J 2,2 dan 6,10 Hz, H-6') dan 7,58 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-2'). Sinyal doublet pada masing-masing 6,35 dan 6,68 ppm memberikan informasi adanya interaksi proton aromatis pada posisi meta. Sinyal doublet pada 7,58 ppm menunjukkan ada interaksi proton pada posisi meta dari pergeseran kimia 7,47 ppm. Sinyal doublet-doublet pada 7,47 ppm menunjukkan bahwa proton tersebut berinteraksi orto dengan sinyal 6,91 ppm dan berinteraksi meta dengan sinyal 7,58 ppm. Sinyal broad pada pergeseran kimia 12,67 ppm merupakan proton dari fenol. Spektrum ^{13}C -RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter terlihat adanya 17 atom karbon. Sinyal pada 55,88 dan 59,49 ppm merupakan sinyal metoksi 7-OMe dan 3-OMe, sinyal pada 92,01 (C-8), 97,49 (C-6), 115,36 (C-5'), 115,50 (C-2') dan 120,40 (C-6') merupakan sinyal dari karbon metin CH. Sinyal pada 104,98 (C-10), 120,50 (C-1'), 137,65 (C-3), 144,99 (C-2), 148,56 (C-3'), 155,70 (C-4'), 155,99 (C-9), 160,93 (C-5), 164,82 (C-7) dan 177,71 ppm (C-4) merupakan atom karbon kuartener. Sinyal pada 177,71 ppm merupakan ciri khas gugus karbonil.

Posisi proton dan karbon senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hasil isolasi diaktualisasikan seperti pada gambar 1.

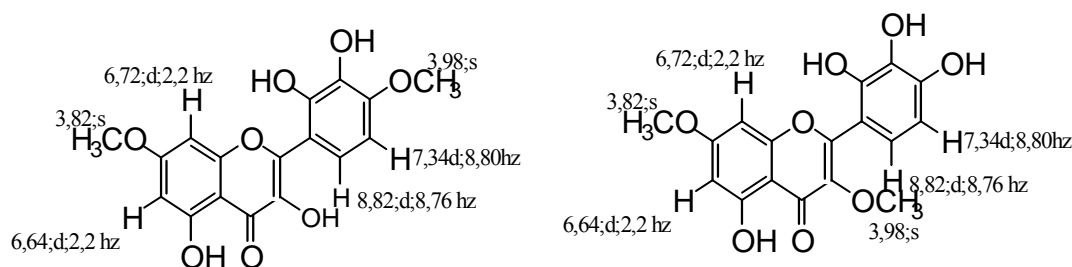
Kuersetin 3,7,4'-trimetileter (2) berwujud kristal jarum berwarna kuning muda mempunyai t.l $173-175^\circ\text{C}$ (Wang, 1989 : $172-174^\circ\text{C}$). Spektrum ultraviolet senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam metanol memberikan λ_{maks} 255 dan 348 nm (Urbatsch : λ_{maks} 254 dan 352 nm). Efek batokromik dengan pereaksi geser AlCl_3 memberikan pergeseran pada λ_{maks} 270 dan 394 nm yang khas dari senyawa flavonoid yang mempunyai gugus karbonil C=O pada posisi C-3 dan gugus hidroksi OH pada posisi C-5 serta adanya gugus dihidroksi pada posisi C-3' dan C-4' yang membentuk senyawa kompleks dengan logam Al, sedangkan dengan pereaksi geser NaOAc tidak memberikan pergeseran dengan kata lain panjang gelombang sama dengan metanol, hal ini menunjukkan adanya gugus metoksi pada posisi C-7 (Harborne, 1982).. Spektrum infra merah senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter dalam KBr sama dengan senyawa kueretin 3,7-dimetileter, serapan tersebut terlihat bahwa bilangan gelombang 3443 cm^{-1} (vibrasi ulur OH), 1641 cm^{-1} (vibrasi ulur C=O yang terkonyugasi), $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ (vibrasi ulur aromatis) dan 1148 cm^{-1} (vibrasi tekuk C-O-C eter). Spektrum ^1H -RMI senyawa kuersetin 3,7-dimetileter dalam DMSO- d_6 memberi informasi adanya 5 proton aromatis dan 3 sinyal gugus metoksi. Sinyal singlet pada 3,81 3,86 dan 3,88 ppm merupakan gugus metoksi pada posisi 7-OMe, 3-OMe dan 4'-OMe. Sinyal proton aromatis terlihat pada pergeseran 6,33 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,67 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 7,09 ppm (1H, d, J 7,3 Hz, H-5'), 7,55 ppm (1H, dd, J 1,5 dan 7,3 Hz, H-6') dan 7,55 ppm (1H, d, J 1,3 Hz, H-2'). Sinyal doublet pada masing-masing 6,33 dan 6,67 ppm memberikan informasi adanya



Gambar 1



Gambar 2



Gambar 3

interaksi proton aromatis pada posisi meta. Sinyal doublet pada 7,55 ppm menunjukkan ada interaksi proton pada posisi meta dari pergeseran kimia 7,55 ppm. Sinyal doublet pada 7,55 menunjukkan adanya interaksi orto dengan 7,09. Sinyal doublet-doublet pada 7,55 ppm menunjukkan bahwa proton tersebut berinteraksi orto dengan sinyal 7,09 ppm dan berinteraksi meta dengan sinyal 7,55 ppm. Sinyal broad pada pergeseran kimia 12,61 ppm merupakan proton dari fenol. Spektrum ^{13}C -RMI senyawa kuersetin 3,7,4'-trimetileter terlihat adanya 18 atom karbon. Sinyal tersebut adalah 55,55 (4-OMe), 55,85 (7-OMe); 59,49 (3-OMe), 92,03 (C-8), 97,51 (C-6), 105,03 (C-10) 111,73 (C-5'), 114,94 (C-2') dan 120,16 (C-6'), 120,04 (C-1'), 137,97 (C-3), 146,15 (C-2), 150,07 (C-3'), 155,31 (C-4'), 156,01 (C-9), 160,69 (C-5), 164,87 (C-7) dan 177,76 ppm (C-4). Sinyal pada 177,76 ppm merupakan ciri khas gugus karbonil.

Posisi proton dan karbon senyawa kuersetin 3,7-dimetileter hasil isolasi diaktualisasikan seperti pada gambar 2.

3,5,2,3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon (3) berwujud padat berwarna kuning muda. Spektrum ultraviolet senyawa 3,5,2,3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon dalam metanol memberikan λ_{maks} 262 dan 344 nm.

Efek batokromik dengan pereaksi geser AlCl_3 memberikan pergeseran pada λ_{maks} 275, 346 dan 395 nm yang khas dari senyawa flavonoid yang mempunyai gugus karbonil $\text{C}=\text{O}$ pada posisi C-3 dan gugus hidroksi OH pada posisi C-5 yang membentuk senyawa kompleks dengan logam Al, sedangkan dengan pereaksi geser NaOAc memberikan λ_{maks} 260 dan 346 nm, hal ini menunjukkan adanya gugus metoksi pada posisi C-7. Spektrum ^1H -RMI senyawa 3,5,2,3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon dalam piridin- d_5 memberi informasi adanya 4 proton aromatis dan 2 sinyal gugus metoksi. Sinyal singlet pada 3,81 dan 3,98 ppm merupakan gugus metoksi pada posisi 7-OMe, dan 4-OMe. Sinyal proton aromatis terlihat pada pergeseran 6,64 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-6), 6,72 ppm (1H, d, J 2,2 Hz, H-8), 7,34 ppm (1H, d, J 8,80 Hz, H-5'), dan 8,22 ppm (1H, d, J 8,76 Hz, H-6'). Sinyal doublet pada masing-masing 6,64 dan 6,72 ppm memberikan informasi adanya interaksi proton aromatis pada posisi meta (H-6 dan H-8). Sinyal doublet pada 7,34 ppm menunjukkan ada interaksi proton pada posisi orto dengan 8,22 ppm (H-5' dan H-6'). Spektrum ^{13}C -RMI senyawa 3,5,2,3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon terlihat adanya 17 atom karbon. Sinyal tersebut adalah 55,91; 59,87; 92,37; 98,27; 106,18; 116,43 (2C); 121,29; 130,86 (2C); 138,61;

Mulyadi Tanjung, Hery Suwito, Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, Mahmiah, Nanik Fauziah dan Unang Supratman

156,63; 156,98; 161,78; 162,17; 165,71; dan 178,92 (C-4). Sinyal pada 177,76 ppm merupakan ciri khas gugus karbonil.

Posisi karbon pada C-4 dapat dipertukarkan pada posisi C-3, hal ini sedang dipelajari lebih lanjut posisi gugus metoksi tersebut (gambar 3).

4. Kesimpulan

Tiga senyawa flavonoid telah dipisahkan dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* BENN yang diidentifikasi sebagai kuersetin- 3,7-dimetileter (1), kuersetin- 3,7,4-trimetileter (2), dan 3,5,2',3'-tetrahidroksi-7,4'-dimetoksiflavon (3). Ditemukannya ketiga senyawa flavonoid merupakan rangkaian penelitian sebelumnya yakni senyawa alkaloid lirioidenin, norarmepavin dan norlaudanisin.

5. Ucapan terimakasih

Terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan melalui Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan dan Proyek DUE-Like Batch III. Terimakasih disampaikan kepada Prof. Dr. Hideo Hayashi dari Lab. Natural of Natural Product Chemistry, Faculty of Agriculture and Biological, Osaka Prefecture University, Sakai, Jepang dan Prof. Dr. A.

Hamid. A. Hadi dan Nurdin Saidi MSc. dari Departement of Chemistry, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia atas bantuan spectrum RMI. Terimakasih disampaikan pula kepada Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur yang telah membantu pengambilan dan mengidentifikasi bahan tanaman.

6. Daftar Pustaka

- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, L. dan Syah, Y.M., 2001, Profil Kimia Annonaceae, *Bull. Indonesian Soc. Of Nat. Pro. Chem.*, 1(1), 1-11.
- Harborne, J.B. and Mabry, T.J., 1982, **The Flavonoids: Advances in Research**, Chapman and Hall Ltd., London-New York, 75-76
- Heyne, K., 1987, **Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II**, Jakarta, Saranawarna Jaya, 765-777
- Tanjung, M., Kristanti, A. N., Suwito, H., Aminah, S.A., Ismaryono, D. dan Supratman, U., 2004, Senyawa Alkaloid dari *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Annonaceae), *Symposium Nasional Kimia Bahan Alam XIV*, ITB, Bandung
- Urbatsch, L.E., Mabry, T.J., Miyakado, M., Ohno, N., and Yoshioka, H., 1976, Flavonol Methyl Ethers From *Ericameria diffusa*, *Phytochemistry*, 15, 440-1
- Wang, Ying, 1989, *Phytochemistry*, 28(9), 2323-7

Kandungan Kimia Daripada *Garcinia mangostana*

Muntaz Abu Bakar ¹⁾, Muhammad Sum Hj Idris, ²⁾

¹⁾ Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, UKM, 43600 Bangi Selangor, Malaysia
emel : garcinia03@yahoo.com

²⁾ Jabatan Kimia, Fakulti Sains, UTM, 81310 Johor Bharu, Malaysia

Abstrak

*Kajian fitokimia telah dilakukan ke atas ekstrak petroleum eter kulit buah spesies *Garcinia mangostana*. Penulenan dengan menggunakan kaedah penyediaan KLN dan penghabluran semula menghasilkan mangostin (1). Tindakbalas penukargantian menghasilkan dimetilmangostin (2) dan triasetoksimangostin (3). Pengenalpastian struktur dilakukan dengan teknik spektroskopi IM, ¹H, ¹³C and 2D RMN.*

1. Pengenalan

Garcinia merupakan salah satu genus daripada famili *Guttiferae* yang juga dikenali sebagai *Clusiaceae*, tumbuhan yang banyak dijumpai di kawasan yang beruaca panas. Famili *Guttiferae* mempunyai 40 genera dan 1000 spesies dan hampir 500 daripada spesies famili *Guttiferae* terdiri daripada berbagai jenis tumbuhan tropika tidak termasuk tumbuhan bakau. (Whitemore 1972). Di Malaysia terdapat 4 genus dan 121 spesies utama iaitu *Garcinia* (Kandis), *Callophyllum* (Bintangor), *Mesua* (Penaga) dan *Mamea* (Whitemore 1972).

Garcinia merupakan genus kedua terbesar, terdiri daripada 400 spesies tetapi di Malaysia hanya 49 spesies sahaja yang dijumpai. *Garcinia* adalah tumbuhan yang bersaiz kecil sehingga ke tumbuhan yang bersaiz sederhana (Morton 1987). Salah satu daripada spesies pokok buah-buahan tropika daripada genus *Garcinia* ialah manggis atau *Garcinia mangostana*. Di Malaysia ia dikenali sebagai mesetor, semetah atau sementah. Manggis dipercayai berasal daripada Pulau Sunda dan Mulucca (Ashton 1988).. Di Malaysia, dipercayai kali pertama dijumpai di kawasan pergunungan Kemaman, Terengganu sebagai pokok hutan. Berdasarkan kepada hasil penyelidikan yang telah dilakukan, banyak sebatian semulajadi yang telah diperolehi

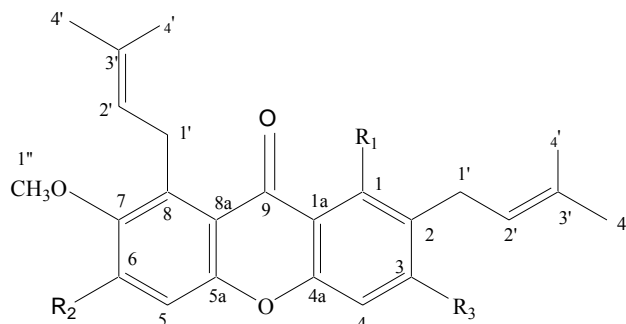
seperti xanton, benzofenon, flavonoid dan terpenoid, namun sebatian yang paling banyak dijumpai ialah xanton (Parveen dan Khan 1988).. Sebatian xanton mempunyai kegunaan yang meluas dalam bidang perubatan, contoh sebagai agen antitumor, antibakteria dan antifungi (Kosela et al 2000). Selain daripada itu, ia juga boleh digunakan untuk merawat pesakit asma dan sebagai pencegah alahan (Bennett et al).

2. Eksperimen

Spektrum IM dirakamkan dengan menggunakan spektrometer 'Fourier Transform Infra Red' (FTIR), Perkin Elmer Model 1600. Spektrum RMN ¹H dan ¹³C direkodkan dengan menggunakan spektrometer RMN VARIAN INOVA yang beroperasi masing-masing pada 400 MHz dan 100MHz. Sampel dilarutkan dengan pelarut deuterio kloroform CDCl₃ dan tetrametilsilana (TMS) sebagai rujukan dalaman.

Pengekstrakan dan pemisahan

Sampel kulit buah *Garcinia mangostana* diperolehi di sekitar Taman Universiti, Skudai, Johor Bharu. Sampel dikeringkan selama beberapa bulan dan dikisar. Serbuk kulit buah *Garcinia mangostana* (820.9 g) diekstrak dalam petroleum eter (3.5 L) dengan menggunakan radas 'Soxhlet' selama 19 jam. Penyejatan pelarut dengan menggunakan alat



- (1) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$
 (2) $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$
 (3) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCOCH}_3$

pengewapan berputar ('rotary evaporator') menghasilkan ekstrak mentah petroleum eter (24.80 g, 3.02 %, t.l. 153-155⁰C) sebagai hablur berwarna kuning. Ekstrak mentah petroleum eter dituliskan dengan menggunakan kaedah penghabluran semula. Ekstrak mentah petroleum eter (7.16 g) dilarutkan ke dalam dietil eter (9 ml) sambil dipanaskan. Petroleum eter (8 ml) ditambah setitik demi setitik sehingga larutan keruh terbentuk dan kemudian dibiarkan semalaman. Penurasan hasil mendakan menghasilkan sebatian **1** (5.57 g).

Sebatian **1** (1.0g) dilarutkan di dalam aseton dan ditambahkan dengan metil iodida serta K₂CO₃. Campuran diaduk pada suhu bilik selama 6 jam. Penyejatan hasil turasan dengan alat pengewapan berputar menghasilkan hablur berwarna kekuningan. Penghabluran semula dengan menggunakan campuran eter dan heksana menghasilkan sebatian **2** (0.24 g)

Sebatian **1** (0.56 g) dilarutkan dalam piridina. Kemudian asetik anhidrida ditambah setitik demi setitik ke dalam larutan dan campuran diaduk pada suhu bilik selama 24 jam. Penyejatan campuran tindak balas menghasilkan cecair likat berwarna perang. Penulenan menggunakan kaedah PTLC menghasilkan sebatian **3** (0.10 g)

Mangostin (**1**), hablur berwarna kuning, t.l 171-173⁰C (ruj : 179⁰C) (Morton 1987). IM v_{maks} cm⁻¹ : 3415.9, 3258.5, 2854.5, 1644.2, 1611.4 dan 1279.7, RMN ¹H [CDCl₃]: δ 1.70, 1.80, 1.88, 1.90(12H, s, 4 \times CH₃), 3.48 (2H, d, CH₂CH=), 3.80(3H, s, OCH₃), 5.27, 5.30(2H, t, 2 \times =CHCH₂), 6.30, 6.80 (2H, s, 2 \times H-Aromatik), 13.75, 13.77(2H, s, 3 \times OH). RMN

¹³C [CDCl₃]: δ 142.48(C-1), 121.37(C-2), 154.48(C-3), 103.59(C-4), 108.35(C-5), 136.99(C-6), 135.82(C-7), 112.16(C-8), 182.00(C-9), 132.14(C-1a), 155.04(C-4a), 153.75(C-5a), 21.40(C-1'), 25.78(C-2'), 25.81(C-3'), 18.18(C-4'), 62.03(C-1').

Dimetilmangostin (**2**), hablur berwarna putih kekuningan, t.l 105-107⁰C (ruj : 108-109⁰C) (Morton1987). IM v_{maks} cm⁻¹ 3451.1, 2922.0, 1645.2, 1598.9 1461.9, 1278.7. RMN ¹H [CDCl₃]: δ 1.65, 1.80, 1.90, 2.10(12H, s, 4 \times CH₃), 3.30(2H, d, CH₂CH=), δ 3.80, 3.98, 4.05(9H, s, 3 \times OCH₃), 5.20, 5.23(2H, t, 2 \times =CHCH₂) 6.48, 6.92 (2H, s, 2 \times H-Aromatik), 13.60(1H, s, OH). RMN ¹³C [CDCl₃]: δ 155.443(C-1), 122.611(C-2), 155.531(C-3), 103.580(C-4), 111.224(C-5), 136.581(C-6), 130.843(C-7), 111.575(C-8), 182.206(C-9), 130.674(C-1a), 158.802(C-4a), 159.755(C-5a), 21.217(C-1'), 25.184(C-2'), 25.251(C-3'), 17.574(C-4'), 60.219(C-1''), 55.961(C-2''), 55.792(C-3'').

Triasetoksimangostin (**3**), cecair likat berwarna perang cerah. IM v_{maks} cm⁻¹ 2964.2, 1643.2, 1608.0, 1581.5, 1458.1, 1280.6. RMN ¹H [CDCl₃]: δ 1.48, 1.67, 1.75, 1.82(12H, s, 4 \times CH₃), 2.02(2H, d, CH₂CH=), 2.34, 2.40, 2.45(9H, s, 3 \times COCH₃), 3.76(3H, s OCH₃), 5.03, 5.18 (2H, t, 2 \times =CHCH₂) 7.13, 7.26(2H, s, 2 \times H-Aromatik). RMN ¹³C [CDCl₃]: δ 146.582(C-1), 122.793(C-2), 148.610(C-3), 110.107(C-4), 108.816(C-5), 138.865(C-6), 137.111(C-7), 113.402(C-8), 175.925(C-9), 132.312(C1a), 152.958(C-4a), 148.336(C-5a), 21.036(C-1'), 23.338(C-2'), 22.492(C-3'), 18.028(C-4'), 60.219(C-1''), 25.440(C-2''), 25.616(C-3''), 26.067(C-4'').

3. Hasil dan Perbincangan

Kajian ke atas kulit buah *Garcinia mangostana* dengan menggunakan kaedah penghabluran semula telah menghasilkan mangostin (1). Tindakbalas penukargantian mangostin menghasilkan dimetilmangostin (2) dan triasetoksimangostin (3).

Mangostin (1) berbentuk hablur berwarna kuning cerah dengan tl 171-173°C. Berdasarkan spektrum IM dan RMN jelas menunjukkan sebatian yang diekstrak adalah mangostin (Mahabusarakam dan Wiriyachitra 1987). Analisis spektrum inframerah menunjukkan sebatian ini mempunyai jalur penyerapan O-H yang lebar pada 3415.7. Serapan 2854.5 bersesuaian dengan regangan C-H bagi kumpulan metil. 1611.4 berpadanan dengan kumpulan berfungsi C=O. Selain itu juga terdapat serapan pada 1644.2 iaitu bersesuaian dengan kehadiran regangan C=C bagi kumpulan alkena manakala penyerapan pada 1582.5 dan 1455.2 menunjukkan terdapatnya C=C bagi gelang aromatik. Kewujudan regangan C-O pula dibuktikan dengan serapan pada 1279.7.

Bagi data resonans magnet nukleus RMN-¹H [CDCl₃] memberikan puncak singlet pada δ1.70, 1.80, 1.88 dan 1.90 ppm yang berpadanan dengan kumpulan metil. Bagi puncak pada δ3.48 memberikan puncak dublet yang berpadanan dengan kumpulan (H-1'). Puncak δ3.80 dengan kemultipelan singlet menunjukkan kehadiran kumpulan metoksi (OCH₃). Anjakan kimia pada δ5.27 dan 5.30 dengan kemultipelan triplet bersesuaian dengan (H-2'). Manakala anjakan kimia pada δ6.30 dan 6.80 dengan kemultipelan singlet menunjukkan kehadiran kehadiran kumpulan aromatik (H-4 dan H-5). Anjakan kimia δ13.80 menunjukkan kehadiran kumpulan hidroksi (H-1)

Bagi spektrum RMN-¹³C memperlihatkan kehadiran jenis 24 karbon. Mangostin (1) mempunyai empat kumpulan metil iaitu pada δ18.186, dua kumpulan metilena pada δ21.401, 12 karbon kuarteneri pada δ112.165, 135.820, 136.995, 108.358, 123.091, 155.041, 153.753, 132.141, 121.379, 142.488, 154.480 dan 103.590. selain itu sebatian ini juga mempunyai satu kumpulan metoksi pada δ62.036 dan satu kumpulan karbonil pada δ182.000.

Pengesahan terhadap struktur mangostin (1) dilakukan dengan menjalankan proses penukargantian iaitu melibatkan tindak balas pemetilan dan pengasilan (Sen et al 1986) mangostin (1). Dimana kumpulan hidroksi pada mangostin (1) digantikan dengan kumpulan metil dan asetoksil.

Dimetilmangostin (2) hablur berwarna putih kekuningan dengan tl 105-107°C. Berdasarkan pada data IM dan RMN menunjukkan sebatian ini sama seperti mangostin, hanya terdapat perubahan pada kumpulan penukarganti (Feodor 1967). Analisis spektrum inframerah menunjukkan jalur serapan O-H yang lemah. Ini disebabkan terdapat serapan O-H pada 3415.1, ini kerana kumpulan O-H pada C-1 tidak mengalami sebarang proses penukargantian, kerana ia membentuk ikatan hidrogen antara kumpulan karbonil dengan OH pada C-1. Bagi data resonans magnet nukleus, RMN-¹H [CDCl₃] berbeza pada puncak metoksi, dimana terdapat puncak δ3.80, 3.98 dan 4.05 dengan kemultipelan singlet menunjukkan kehadiran kumpulan metoksi OCH₃, iaitu sebanyak 2 kumpulan metoksi telah bertambah. Manakala anjakan kimia yang terakhir iaitu δ13.60 menunjukkan kehadiran masih terdapat kumpulan hidroksil (H-1). Bagi spektrum RMN-¹³C memperlihatkan kehadiran 26 karbon, iaitu pertambahan karbon disebabkan pertambahan kumpulan metoksi.

Triasetoksimangostin (3) cecair likat berwarna perang cerah. Analisis spektrum inframerah menunjukkan sebatian ini tidak lagi mempunyai jalur serapan O-H. Ini adalah kerana semua kumpulan O-H diganti dengan kumpulan asetat (Ravikumar et al 1988). Bagi data resonans magnet nukleus, RMN-¹H [CDCl₃] menunjukkan puncak pada δ3.76 dengan kemultipelan singlet menunjukkan kehadiran kumpulan metoksil pada (H-1'') manakala δ2.38, 2.40 dan 2.45 dengan kemultipelan singlet menunjukkan kehadiran kumpulan asetoksil OCOCH₃ pada (H-2'', H-3'' dan H-4'') dimana sebanyak 3 kumpulan asetoksil telah bertambah. Bagi RMN-¹³C [CDCl₃] menunjukkan kehadiran 30 jenis karbon, iaitu pertambahan karbon disebabkan pertambahan kumpulan asetoksil.

4. Kesimpulan

Pemisahan ke atas ekstrak petroleum eter kulit buah *Garcinia mangostana* berjaya

mengasingkan mangostin. Tindak balas penukargantian menghasilkan dimetilmangostin dan triasetoksimangostin.

5. Penghargaan

Ucapan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi (09-02-02-0086 EA227) serta kepada Prof Dato' Dr Ikram Md Said dan Dr Jalifah Latip

6. Rujukan

Ashton P.S. 1988. Manual of The Non-Dipterocarp Trees Of Sarawak. Sarawak Branch:

Bennett G.J., Lee H.H., Lee L.P. Nov-Dec, 1990. Synthesis of minor xanthone from *Garcinia mangostana*. *Journal Of Natural Product*. **53** : 1463-1470.

Feodor S. 1967. Structure of dimethyl-mangostin and mangostin. *Chemical communication*. **19** : 1015-1017.

Kosela S., Hu L.H., Rachmatia T., Hanafi M. dan Sim K.Y. 2000. Three new pyranoxanthones from *Garcinia dulcis*. *Journal Natural Product*. **63** : 406-407.

Mahabusarakam W., Wiriyaichitra P. 1987. Chemical constituent of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products*. **50** : 474-478.

Morton J.F. 1987. In fruit Of Warm Climate. Morton. 301-304.

Parveen M. dan Khan N.D. 1988. Two xanthones from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*. **27**: 3696-3700.

Ravikumar K., Rajan S.S., Sivakumar K., Natrajan S. 1988. Structure of mangostin acetate. *Acta Crystallographica, Section C*. C44 : 1996-1999.

Sen A.K., Sarkar K.K, Majunder P.C., Banerji N. 1986. Garcinone D, a new xanthone from *Garcinia mangostana*. *Indian Journal of Chemistry, Section B*. **25(B)** : 1157-1158

Wade L.G., JR 2003. *Organic Chemistry*. Pearson Education, INC. Upper Saddle River, New Jersey. 345-430, 490-499, 544-545.

Whitemore T.C. 1972. *Tree Flora of Malaya*. Kuala Lumpur: Longman Malaysia Sdn. Bhd. **2** : 162-170.

Penyediaan Membran Biomolekul Untuk Pembinaan Biosensor Bagi Pengesanan Ketoksikan Logam Berat

Musa Ahmad, Francis Wong dan Lee Yook Heng

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor DE
e-mail : andong@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Membran biomolekul sol-gel telah berjaya direkabentuk dalam kajian ini untuk pembinaan biosensor bagi pengesanan logam berat. Penunjuk pH jenis lipofilik kromoionofor (Kr, ETH5294) telah dipegunkan dalam filem sol-gel untuk pembinaan sensor pH. Lapisan Kr memberi respon pH yang linear pada julat pH 5 - 10 ($R^2 = 0.9834$) dan tiada masalah larut lesap diperhatikan dalam tempoh kajian selama 30 minit. Biosensor optik yang terdiri daripada Kr yang terdop di dalam filem sol gel dan diselaputi dengan lapisan filem sol-gel kedua yang dipegunkan dengan enzim urease, berjaya menghasilkan biosensor untuk pengesanan ketoksikan logam berat. Biosensor ini memerlukan lapisan Kr dalam keadaan berasid untuk mengesan kehadiran alkali semasa tindak balas antara enzim urease dengan urea. Biosensor ini menunjukkan sifat optimum pada pH 6.5, muatan enzim 10 mg/mL dan kepekatan penimbal tris-HCl 30 mM. Julat rangsangan linear diperolehi pada julat kepekatan urea 30 - 50 mM ($R^2 = 0.9743$, LOD = 26.5 mM). Dalam pengesanan ketoksikan logam berat, masa pengeraman optimum biosensor ini adalah 10 minit dan jujukan ketoksikan yang dicerap ialah $Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+}$ pada julat kepekatan logam 5 - 100 ppm dengan julat linear terhadap ion kuprum pada julat kepekatan 1 - 8 ppm. Biosensor ketoksikan logam berat yang dihasilkan dalam kajian ini telah menunjukkan keputusan yang bolehbanding terhadap keputusan yang diperolehi daripada kaedah konvensional seperti spektrometri serapan atom (AAS).

1. Pendahuluan

Usaha awal telah dilakukan untuk mengesan kehadiran urea menggunakan biosensor urea seperti yang telah majukan oleh Guilbault dan Montalvo pada akhir 60-an (Guilbault & Montalvo 1969, Montalvo & Guilbault 1969). Biosensor untuk logam berat berasaskan urease merupakan biosensor pilihan kerana kepekaan yang tinggi dan stabil, murah dan masa respon yang singkat (Tsai et al. 2003). Kaedah sol-gel adalah satu kaedah pemegunan yang dapat memerangkap biomolekul dalam silika poros untuk mengekalkan aktiviti pemangkinan bagi enzim dalam keadaan yang sesuai (Anvir et al. 1994). Sehingga kini, pemegunan urease dalam sol-gel banyak dilaporkan dengan tujuan untuk pengesanan urea (Gulcev et al. 2002; Lee et al. 2000; Ogura et al. 1999) dan logam berat (Tsai

et al. 2003). Dalam kajian ini, kromoionofor telah berjaya dipegunkan dalam lapisan sol-gel dan telah digunakan sebagai biosensor optik untuk pengesanan ketoksikan logam berat selepas pemegunan enzim urease. Respon biosensor optik terhadap substrat urea dan logam berat telah dikaji. Kaedah biosensor dan kaedah spektroskopi serapan atom telah dibandingkan untuk pengesanan ion kuprum.

2. Percobaan

Bahan kimia

Enzim urease (EC 3.5.1.5) (jenis III) daripada sumber pokok *jack beans* telah dibeli daripada Sigma, tetraetilortosilikat (TEOS), kromoionofor (Kr), plumbum nitrat dan kadmium nitrat tetrahidrat telah diperolehi daripada Fluka. Kuprum (II) nitrat trihidrat

dibekalkan oleh *Hayashi Pure Chemical*. Tris-HCl dibeli daripada DUCHEFA dan klorofenol merah (CPR) diperolehi daripada Riedel-De Haën. Semua larutan akues telah disediakan menggunakan air suling nyahion yang diperolehi daripada alat Maxima Ultra Pure Water Elga.

Instrumentasi

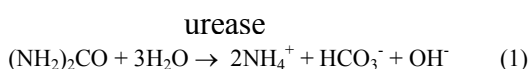
Pengukuran serapan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UL-Nampak jenis Varian dua alur cahaya (Model Cary 100). Komputer Dell telah digunakan untuk memperoleh data. Parameter bagi instrumen ini telah dikawal dengan perisian Cary-Win (Varian) dan data yang diperolehi diproses menggunakan perisian yang sama.

Penyediaan larutan sol-gel dan lapisan biosensor

Larutan sol-gel telah disediakan menikut prosedur yang pernah dilaporkan sebelum ini dengan sedikit modifikasi (Kumar et al. 2000; Narang et al. 1994; Wong et al. 2003). Untuk penyediaan membran sensor pH, kuantiti tertentu Kr, larutan sol-gel dan larutan penimbal tris-HCl telah dicampurkan ke dalam botol endorf sehingga homogen. Campuran ini kemudiannya dipipetkan ke atas matriks filem selulosa asetat dan maktriks diputar untuk menghasilkan filem sol-gel. Filem sensor pH ini telah disimpan dalam kotak yang kedap udara dan diletakkan dalam peti sejuk (4 °C). Filem ini boleh disimpan untuk tempoh satu minggu tanpa peretakan. Untuk penghasilan lapisan bio-reseptor, larutan enzim urease telah dicampurkan dengan larutan sol ke dalam botol endorf sehingga campuran menjadi homogen. Kemudian, campuran itu dipipetkan ke atas lapisan sol-gel pertama yang dipegunkan dengan Kr. Selepas itu, hasil filem ini diputar-spinkan.

Kaedah analisis

Urea dihidrolisiskan oleh urease seperti dalam Persamaan 1 (Kovács et al. 2003).



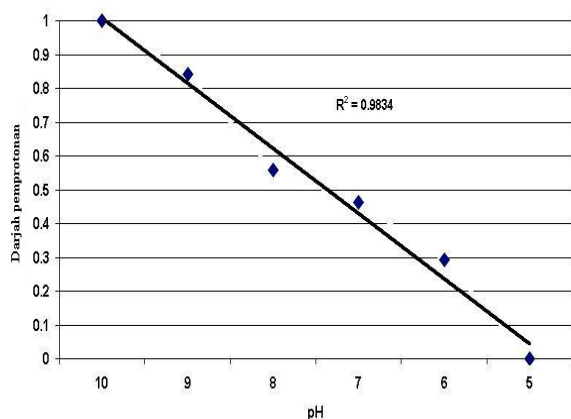
Ion ammonium yang dihasilkan daripada tindak balas enzim akan mengubah warna Kr dari biru (543 nm) kepada merah ungu (609 nm). Perubahan serapan menyebabkan perubahan proses pemprotonan dan penyahprotonan iaitu pada 543 nm, penyahprotonan berlaku dan pemprotonan Kr berlaku pada 609 nm.

3. Hasil dan Perbincangan

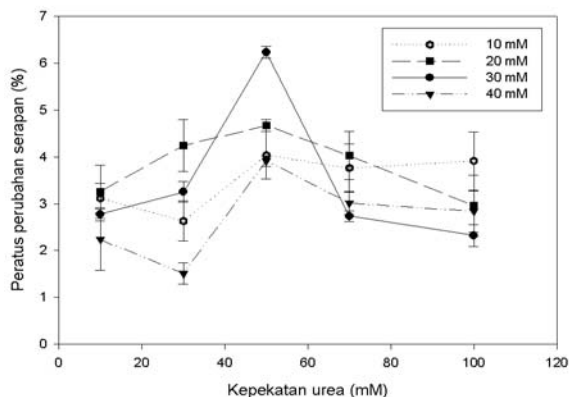
Rajah 1 menunjukkan julat respon linear pH yang lebih besar (pH 5 – 10) berbanding filem akrilat tanpa pemplastik iaitu pada julat pH 5.5 – 8.0 (Lee et al. 2003) dan filem PVC dengan julat pH 9 – 11 (Bakker & Simon 1992). Julat linear pH bagi Kr terpegun dalam filem sol-gel didapati merangkumi julat pH aktif bagi enzim urease (pH 4.0 – 9.0) dengan pH optimum pada 7.01 (Fidaleo & Lavecchia 2003). Tambahan pula, penyediaan filem sensor pH sol-gel yang digunakan dalam kajian ini adalah lebih mudah dan memakan masa yang lebih singkat berbanding kaedah penyediaan yang pernah dilaporkan sebelum ini. Gupta dan Sharma telah melaporkan bahawa lapisan sol-gel penunjuk pH yang telah disediakan memerlukan sekitar 20 hari sebelum ia boleh digunakan (Gupta & Sharma 1997).

Kepekatan larutan penimbal tris-HCl semasa penyediaan larutan urea mempengaruhi kepekaan biosensor kerana kepekaan biosensor banyak bergantung kepada pH dan kepekatan larutan penimbal (Koncki et al. 1995). Dalam kajian ini, kepekatan penimbal tris-HCl dalam julat 10 – 40 mM telah dikaji dan hasil yang diperolehi adalah seperti ditunjukkan dalam Rajah 2. Biosensor ini menunjukkan kepekaan yang paling tinggi untuk kepekatan penimbal tris-HCl 30 mM apabila 50 mM larutan urea digunakan. Selepas pengoptimuman keadaan pengukuran urea, respon biosensor terhadap urea telah dikaji dan respon dinilai pada kepekatan penimbal 50 mM. Merujuk kepada Rajah 3, tren peningkatan dan penurunan peratus perubahan serapan yang diperolehi adalah menyamai tren yang dilaporkan oleh Tsai et al. (2003). Mereka mendapati bahawa pH meningkat dari 7.1 ke 9.5 apabila kepekatan urea meningkat kepada 500 mM. Dalam kajian ini, apabila kepekatan urea meningkat kepada 70 mM, pH meningkat dari 6.5 ke 8.5. Penambahan kepekatan urea kepada 100 mM telah menunjukkan peningkatan pH ke 8.8. Peningkatan pH yang mendadak akibat penghasilan ion hidroksida yang lebih tinggi mungkin akan meningkatkan nilai pH dalam persekitaran mikro bagi sol-gel dan ini akan mengurangkan aktiviti enzim urease apabila pH optimum enzim urease iaitu pH 7.5 dilampaui (Tsai et al. 2003).

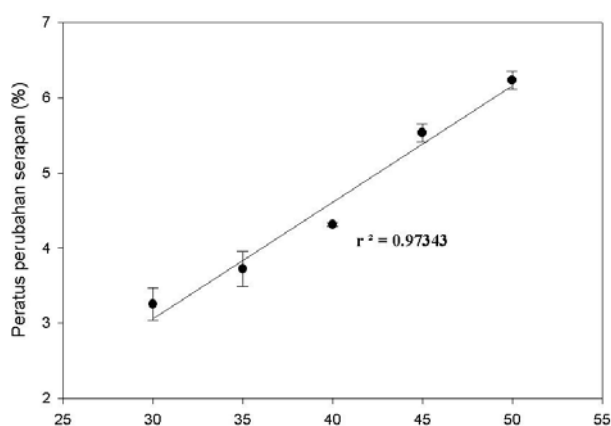
Kesan berbagai logam berat terhadap aktiviti urease dalam biosensor telah dikaji (Rajah 4).



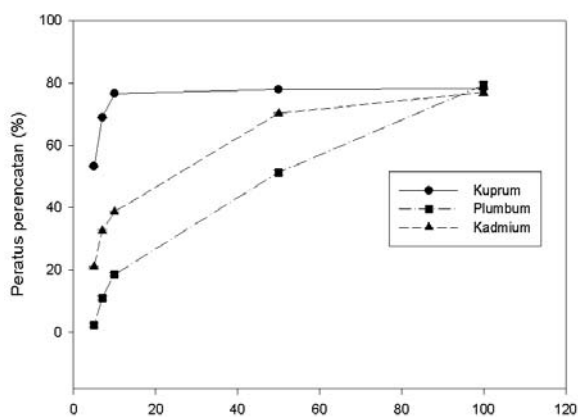
Rajah 1: Perubahan darjah pemprotonan (α) bagi pemegungan Kr dalam filem sol-gel terhadap berbagai pH



Rajah 2: Kesan perubahan kepekatan larutan penimbal tris-HCl bagi respon biosensor



Rajah 3: Respon optik bagi biosensor ketoksikan logam berat terhadap perubahan kepekatan substrat urea



Rajah 4: Kesan bagi perbezaan kepekatan logam-logam berat pada tahap perencatan untuk biosensor optik

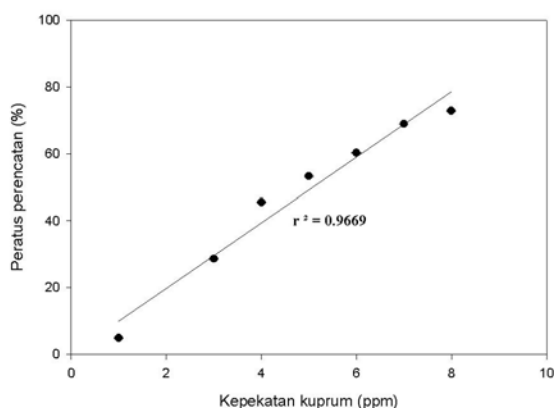
Kesan perencatan yang tinggi dapat diperhatikan untuk logam Cu(II) dengan peratus perencatan 53 % pada kepekatan 5 ppm berbanding 21 % dan 2 % bagi Cd(II) dan Pb(II) masing-masingnya. Lengkung kalibrasi bagi ion Cu(II) mencapai peratus perencatan sehingga 78 % pada kepekatan Cu(II) 10 ppm dan mencapai peratus perencatan maksimum selepas kepekatan ini. Manakala bagi ion Cd(II) dan ion Pb(II) pula, peratus perencatan tersebut hanya tercapai apabila biosensor didedahkan kepada kepekatan logam 100 ppm. Pengesanan optik berdasarkan perencatan enzim dalam larutan bebas oleh ion logam dengan menggunakan Kr dalam membran PVC menunjukkan kepekaan yang tinggi terhadap

ion Cu(II) manakala ion Pb(II) menunjukkan kepekaan yang kurang berbanding ion Cd(II) (Preiniger & Wolfbies 1996).

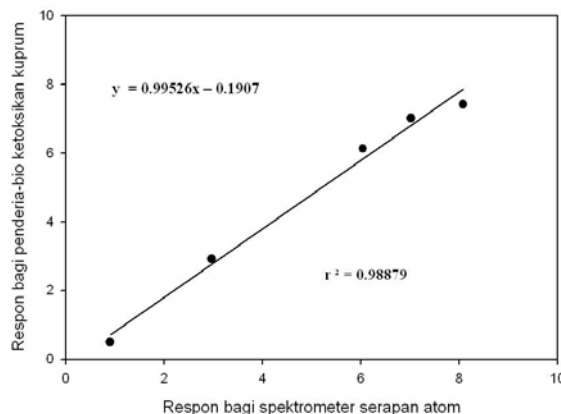
Oleh kerana ion Cu(II) menunjukkan kepekaan yang paling tinggi, ion ini telah digunakan untuk memplotkan lengkung kalibrasi (Rajah 5). Suatu respon linear diperolehi pada kepekatan kurang daripada 10 ppm. Keputusan yang diperolehi daripada kaedah biosensor dan kaedah AAS telah dibandingkan (Rajah 6) dan hasil kajian menunjukkan bahawa kedua-dua kaedah ini adalah bolehbanding.

4. Kesimpulan

Kajian ini menunjukkan bahawa biosensor ketoksikan logam berat yang dapat mengesan



Rajah 5: Plot kalibrasi pada julat linear bagi ion kuprum (II) yang diperolehi daripada biosensor optik



Rajah 6: Plot validasi antara kaedah biosensor ketoksikan logam berat optik dengan kaedah AAS

kehadiran urea dan logam berat khususnya ion Cu^{2+} telah berjaya dibangunkan. Biosensor ini memberikan respon linear bagi urea pada julat kepekatan 30 – 50 mM. Biosensor ini telah menunjukkan respon linear dalam julat kepekatan ion Cu^{2+} 1 - 8 ppm. Kaedah SSA dan biosensor ini telah menunjukkan keputusan yang boleh banding.

5. Ucapan Terimakasih

Kami ingin merakamkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi Malaysia untuk biasiswa NSF dan gran penyelidikan IRPA 09-03-03-006.

6. Daftar Pustaka

Avnir, D., Braun, S., Lev, O. & Ottolenghi, M. 1994. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem. Mater.* **6**: 1605-1614.

Bakker, E. & Simon, W. 1992. Selectivity of ion-sensitive bulk optodes. *Anal. Chem.* **64**: 1805-1812.

Blyth, D.J., Aylott, J.W., Moir, J.W.B., Richardson, D.J. & Russell, D.A. 1999. Optical biosensing of nitric oxide using the metalloprotein cytochrome C. *Analyst* **124**: 129-134.

Fidaleo, M. & Lavecchia, R. 2003. Kinetic study of enzymatic urea hydrolysis in the pH range 4–9. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **17**(4): 311-318

Gulcev, M.D., Goring, G.L.G., Rakic, M. & Brennan, J.D. 2002. Reagentless pH-based biosensing using a fluorescently-labelled dextran co-entrapped with a hydrolytic enzyme in sol-gel derived nanocomposite films. *Anal. Chim. Acta* **457**: 47-59.

Gupta, B.D. & Sharma, D.K. 1997. Evanescent wave absorption based fiber optic pH sensor

prepared by doped sol-gel immobilization technique. *Optics Comm.* **140**: 32-35.

Koncki, R., Mohr, G.J. & Wolfbies, O.S. 1995. Enzyme biosensor for urea based on a novel pH bulk optode membrane. *Biosens. Bioelectron.* **10**: 653-659.

Kovács, B., Nagy, G., Dombi, R. & Tóth, K. 2003. Optical biosensor for urea with improved response time. *Biosens. Bioelectron.* **18**: 111-118.

Lee, Y.H., Teh, H.F., Loh, H.C. & Musa, A. 2003. Influence of methacrylic-acrylic copolymer composition on the plasticizer-free optode films for pH sensors. *Sensors* **3**: 83-90.

Lee, W.Y., Kim, S.R., Kim, T.H., Lee, K.S., Shin, M.C. & Park, J.K. 2000. Sol-gel-derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum. *Anal. Chim. Acta* **404**: 195-203.

Montalvo, J.G. Jr. & Guilbault, G.G. 1969. Sensitized cation selective electrode. *Anal. Chem.* **41**: 1897-1899.

Ogura, K., Nakaoka, N., Kobayashi, M. & Fuji, A. 1999. Thermogravimetry/mass spectrometry of urease-immobilized sol-gel silica and the application of such a urease-modified electrode to the potentiometric determination of urea. *Anal. Chim. Acta* **384**: 219-225.

Preininger, C. & Wolfbeis, O. S. 1996. Disposable cuvette test with intergrated sensor layer for enzymatic determination of heavy metals. *Biosens. Bioelectron.* **11**(10): 981-990.

Tsai, H.C., Doong, R.A., Chiang, H.C. & Chen, K.T. 2003. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* **481**: 75-84.



Vitamin E and Down Syndrome

Musalmah, M.¹, Sue Mian, T.¹, Isnida, I.¹, Gapor, M.T.² and Wan Nghah, W.Z.¹

¹Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine,
Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur
²Malaysian Palm Oil Board, Selangor, Malaysia.

Abstract

Premature aging and neurodegeneration are some of the clinical features associated with Down syndrome. The syndrome results from inheriting 3 copies of chromosome 21 which is the location of the gene encoding the enzyme Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1). Over expression of SOD1 leads to hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation and free radicals with resultant damage to macromolecules. H₂O₂ also stimulates neuron cells to undergo apoptosis. Thus in this project, we evaluated the possible protective effect of vitamin E subfamilies, α -tocopherol (ATF) and γ -tocotrienol (GTT) in preventing DNA damage as well as its neuroprotective effect. Blood samples were collected from 11 normal and 8 DS patients aged 1-7 years old. Analysis were made of the basal and G2 DNA damage in lymphocytes cultured with and without 100 μ M GTT. DNA damage was determined using the single cell gel electrophoresis or known as the comet assay. DNA damage in G2 was determined in lymphocyte cultures treated with 5mM caffeine, 2h before harvesting. Neuroprotective effects of vitamin E subfamilies, ATF and GTT, were compared by determining cell viability and apoptosis with and without vitamin E pretreatment against H₂O₂-induced damage in astrocytes and neurons of rat primary cultures as well as in human neuroblastoma cell line. Results showed that vitamin E treatment decreased basal and G2 DNA damage both in control and DS lymphocytes. ATF and GTT offered neuroprotection by increasing cell viability and decreased rate of apoptosis induced with H₂O₂ treatment in astrocytes, neurons and neuroblastoma cell line. Thus in conclusion, vitamin E was found to offer protection against DNA damage in DS lymphocytes and H₂O₂-induced apoptosis in CNS cells.

Paper is not available

Biodiversitas Mikroorganisme Termofilik Kawah Manuk

M. P. Widhiastuty dan Akhmaloka

Departemen Kimia, FMIPA, ITB
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: loka@chem.itb.ac.id

Abstrak

Studi biodiversitas merupakan studi awal yang diperlukan untuk mengetahui jenis jenis mikroorganisme termofilik yang dimiliki daerah vulkanik Indonesia. Kawah Manuk dengan kondisi lingkungan berupa suhu 65 – 90°C dan pH 2 – 3,3 merupakan salah satu habitat yang khas bagi mikroorganisme termofilik Indonesia. Pada penelitian ini mikroorganisme dalam sampel air Kawah Manuk yang mengandung 40% lumpur telah berhasil dikultivasi di media Thermus. DNA kromosom dari kultur tersebut telah diisolasi dan fragmen gen 16s rRNA dari organisme ini telah diamplifikasikan. Hasil PCR berupa polinukleotida berukuran 323 pb ini akan digunakan untuk analisa filogenetik mikroorganisme termofilik Kawah Manuk.

Kata kunci: biodiversitas, mikroorganisme termofilik, kawah manuk.

1. Pendahuluan

Studi mengenai keanekaragaman organisme diperlukan untuk memahami jenis jenis organisme yang ada dan keterkaitan antar satu organisme dengan organisme lainnya. Pengetahuan mengenai mikroorganisme relatif lebih sedikit diketahui dibandingkan dengan organisme pada kelompok eucarya, yang disebabkan oleh ukuran yang kecil dan morfologi yang lebih sederhana. Namun demikian mikroorganisme memiliki kemampuan untuk hidup pada lingkungan yang sangat bervariasi. Lingkungan dengan kondisi yang tidak umum seperti, pH dan suhu yang ekstrim, kadar oksigen yang rendah, dan lain sebagainya telah lama menjadi obyek penelitian dalam studi mikroorganisme. Stetter (1996). Daerah vulkanik dengan lingkungan yang bersuhu tinggi merupakan salah satu diantaranya. Mikroorganisme yang hidup pada lingkungan bersuhu tinggi ini dikenal sebagai mikroorganisme termofilik. Studi biodiversitas mikroorganisme termofilik telah mengalami banyak kemajuan dengan ditemukannya berbagai cabang cabang baru pada pohon filogenetik yang disusun berdasarkan urutan subunit kecil rRNA, baik dari kelompok

bacteria maupun archaea. Barns, S.M., (1994). Kemajuan ini diikuti pula oleh keberhasilan dalam mengisolasi mikroorganisme yang sebelumnya tidak dapat dikultivasi. Walaupun demikian, keberhasilan ini diperkirakan hanya meliputi 1% dari keseluruhan mikroorganisme yang ada. Pace (1997). Dengan kata lain masih banyak studi yang diperlukan dalam bidang ini, termasuk salah satunya adalah mempelajari jenis jenis mikroorganisme termofilik Indonesia. Indonesia merupakan negara kepulauan yang banyak memiliki daerah dengan aktivitas vulkanik yang tinggi. Terdapat sekitar 150 gunung berapi di Indonesia, 43 diantaranya terdapat di Jawa Barat. Pada masing masing gunung ini ditemukan banyak kawah dan sumber air panas dengan kondisi fisik, seperti suhu, pH dan kadar garam yang berbeda beda. Dalam penelitian ini dipelajari keanekaragaman mikroorganisme termofilik di Kawah Manuk, salah satu kawah yang terdapat di kawasan wisata alam Kamojang, Jawa Barat. Kawah Manuk merupakan kawah berlumpur panas yang bersifat asam. Studi biodiversitas mikroorganisme termofilik Kawah Manuk didasarkan pada analisa urutan fragmen gen 16s rRNA hasil amplifikasi PCR kultur

mikroorganisme isolat kawah Manuk pada media *Thermus*.

2. Percobaan

Sampel air panas. Sebanyak 2 liter air kawah disimpan dalam termos untuk menjaga suhunya agar tidak banyak berubah. Sesampainya di laboratorium, sampel sesegera mungkin difiltrasi dengan kertas saring untuk memisahkan endapan lumpur. Filtrat yang diperoleh kemudian difiltrasi lebih lanjut menggunakan filter 0,2 μ m dengan tujuan agar mikroorganisme yang ada terkonsentrasi pada filter. Selanjutnya filter yang mengandung mikroorganisme kawah Manuk dilarutkan dalam 5 mL aqua dm steril dan dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL. Sebanyak 250 μ L suspensi mikroorganisme ini dikulturkan di media *Thermus*, Atlas(1993).

Kultivasi. Kultivasi mikroorganisme dilakukan dengan 2 metoda. Metoda pertama adalah menambahkan 5 mL air kawah masing masing ke 15 mL media *Thermus* yang steril. Kultur kemudian diinkubasi dalam termos yang berisi air panas. Sesampainya di laboratorium kultur dipindahkan ke inkubator dengan suhu 60°C. Setelah selang waktu 22 jam kultur dipindahkan ke inkubator suhu 70°C. Metoda yang kedua adalah menggunakan sel yang merupakan hasil filtrasi di filter 0,2 μ m dan dilarutkan dalam aqua dm steril. Sebanyak 250 μ L suspensi sel ini ditambahkan ke dalam 5 mL media *Thermus* steril kemudian diinkubasi di suhu 70°C. Kultur yang dihasilkan, dibuat menjadi pelet sel (disimpan di -20°C) yang akan digunakan untuk keperluan isolasi DNA.

Lisis sel dan Isolasi DNA. Lisis sel dan isolasi DNA kromosom dilakukan seperti yang digambarkan oleh Baker dengan sedikit modifikasi. Baker *et al.* (2001). Pellet sel ditambahkan 400 μ L buffer lisis (Lysozym 5mg/mL dalam tris-Cl 10 mM pH 8, proteinase K 0,5 mg/mL, SDS 2%, Na-EDTA 100mM) dan diinkubasi di 37°C selama 1 jam dilanjutkan dengan inkubasi di 55°C selama 30 menit. Selanjutnya ke dalam campuran ditambahkan fenol-kloroform-isoamil alkohol (25:24:1, vol/vol) dengan volume yang sama. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil fasa aqueous setelah sentrifugasi di 4000 rpm selama 10 menit dan dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan kloroform-isoamil

alkohol (25:24:1, vol/vol) dengan volume yang sama. Ekstraksi ini dilakukan sebanyak 3 kali. DNA diendapkan dengan penambahan 805 μ L etanol absolut dan 45 μ L Na-asetat 3M, dan disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. DNA dicuci dengan 50 μ L etanol 70% dalam 100mM tris. DNA diresuspensi ke dalam ddH₂O steril.

Amplifikasi PCR. ‘Touchdown’ PCR dilakukan dengan sepasang primer untuk gen 16S rRNA bakteri yang salah satunya dilengkapi dengan GC-clamp sebanyak 40 basa pada ujung 5’nya. Siklus suhu untuk PCR adalah 1 menit denaturasi pada 94°C, 1 menit annealing (lihat dibawah), dan 3 menit perpanjangan rantai pada 72°C. Suhu annealing diturunkan dari 53°C menjadi 43°C dalam 10 siklus dan diikuti dengan 20 siklus tambahan pada suhu 43°C. Ferris *et al.* (1996).

3. Hasil dan pembahasan

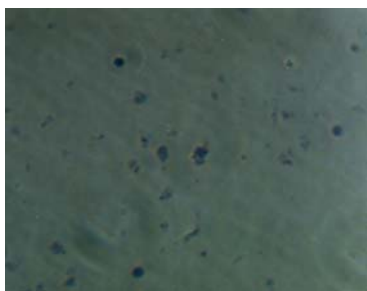
Parameter fisik air kawah Manuk
Pengambilan sampel dilakukan 2 kali, pada bulan Juli dan Oktober 2004 di empat titik yang berbeda. Parameter fisik air kawah memiliki sedikit perbedaan antara sampel yang diambil di bulan Juli dengan sampel yang diambil di bulan Oktober dikarenakan kandungan air pada Kawah Manuk meningkat pada bulan Oktober. pH air kawah berkisar 2 – 3,3. Suhu berkisar 65 - 90°C. Air kawah mengandung lumpur hitam yang sangat pekat dengan kandungan tanah \pm 40%. Walaupun air Kawah Manuk memiliki suhu yang tinggi dan pH yang sangat rendah namun kawah ini dikelilingi oleh tanaman yang cukup rapat. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan senyawa organik yang dikandung oleh air Kawah Manuk yang berfungsi sebagai sumber karbon bagi mikroorganisme yang tumbuh di dalamnya.

Tabel 1. Parameter fisik air Kawah Manuk yang diukur pada bulan Juli dan Oktober 2004

Parameter Fisik	Juli 2004	Oktober 2004
pH	2 - 3	3,3
suhu	90 – 92°C	65 – 87°C

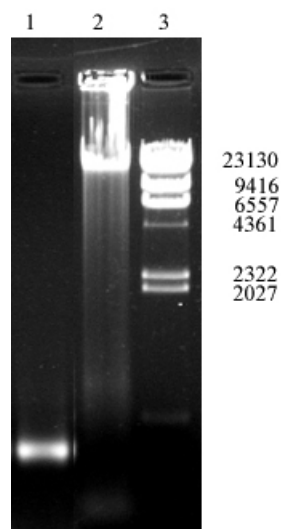
Kultivasi mikroorganisme. Kultivasi dilakukan dengan 2 metoda seperti yang digambarkan pada bagian percobaan. Metoda pertama didasarkan pada prinsip media pengayaan dimana ke dalam sampel air kawah ditambahkan media *Thermus* yang mengandung bahan bahan yang merupakan

sumber karbon, nitrogen dan mineral. Pada metoda kedua, kultivasi dilakukan dengan pendekatan yang berbeda dimana mikroorganisme yang dikandung sampel air kawah dipekatkan dengan cara filtrasi. Sehingga diharapkan diperoleh suspensi mikroorganisme dengan konsentrasi yang cukup tinggi. Suspensi sel yang dihasilkan ini kemudian dikulturkan pada media *Thermus*. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan jenis mikroorganisme hasil kultivasi sebanyak mungkin. Setelah inkubasi selama 4 hari, terlihat kekeruhan pada hasil kultivasi dengan kedua metoda. Analisa kultur dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali menunjukkan bahwa telah tumbuh mikroorganisme di kedua media seperti yang terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Morfologi mikroorganisme termofilik Kawah Manuk (perbesaran 1000X)

DNA Kromosom. DNA kromosom yang diisolasi dari kultur di media *Thermus* dianalisa dengan elektroforesis agarosa. Elektroforegram menunjukkan DNA kromosom yang diisolasi berukuran sekitar 10000 pb seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Munculnya satu pita menunjukkan bahwa DNA kromosom yang berhasil diisolasi tidak mengalami degradasi. Perhitungan konsentrasi DNA kromosom dilakukan dengan mengukur absorbansinya pada λ 260 dimana konsentrasi yang terhitung 551,4 $\mu\text{g/ml}$. DNA kromosom ini memiliki kemurnian cukup baik dilihat dari harga perbandingan A_{260} terhadap A_{280} yang menunjukkan nilai 1,82. Kemurnian DNA yang baik adalah jika A_{260}/A_{280} berkisar antara 1,8 – 1,9.



Gambar 2.

Lajur 1: Elektroforegram agarosa hasil PCR gen 16s rRNA.

Lajur 2: Elektroforegram agarosa DNA kromosom kultur isolat kawah manuk.

Lajur 3: Marker DNA λ /Hind III

PCR. Primer yang digunakan dalam penelitian ini merupakan primer yang diharapkan mampu mengamplifikasi secara parsial gen 16s rRNA bakteri yang meliputi daerah hipervariabel V9. Gray (1984). Hasil amplifikasi adalah berupa polinukleotida dengan panjang 323 pb seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Penggunaan GC-clamp sebanyak 40 basa pada ujung 5' dari salah satu primer bertujuan agar hasil PCR tersebut nantinya dapat digunakan pada analisa lanjutan yaitu analisa DGGE. DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) telah banyak digunakan dalam studi biodiversitas mikroorganisme, Muyzer (1998), sehingga penggunaan DGGE dalam penelitian ini nantinya diharapkan mampu memperlihatkan biodiversitas dari mikroorganisme Kawah Manuk.

4. Daftar Pustaka

- Atlas, R.M., (2002). Handbook of Microbiological Media, CRC Press. Inc., USA, hal. 887.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D. A., Suharto, A. R., (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs, *FEMS Microbiol. Lett.*, 103 – 109.
- Barns, S.M., Fundyaga, R.E., Jeffries, M.W., Pace, N.R., (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 91, 1609-1013

Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M., (1996). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2), 340 – 346

Gray, M.W., Sankoff, D., Cedergren, R.J., (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res.*, 12(14), 5837-5852

Muyzer, G., Smalla, K., (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127–141

Pace, N.R., (1997) A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere, *Science*, 276, 734 – 740

Stetter, K.O., (1996). Hyperthermophilic procaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 149-158.

Woese, C. R., (1987) Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221 – 2

Keragaman Senyawa-senyawa Oligostilbenoid dari Spesies *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae)

Nanik Siti Aminah^a, Sjamsul Arifin Achmad^b, Masatake Niwa^c,
Yana M Syah^b, Mariko Kitajima^d,
Euis Holisotan Hakim^b

^aDept. of Chemistry, Faculty of Mathematic and Sciences, Airlangga University, Kampus C UNAIR Jl. Mulyorejo Surabaya, Indonesia, 60115
E-mail : nanik_sa2000@yahoo.com

^bDept. of Chemistry, Institut Teknologi Bandung Jl. Ganesha 10 Bandung, 40132, Indonesia

^cFaculty of Pharmacy, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468-8503 Japan

^dCenter for Medicinal Resources, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263, Japan

Abstract

Eight oligostilbenoid compounds had been isolated from the ethyl acetate extract of the stem bark of *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae). These compounds were distributed to monomer, dimer, trimer, and tetramer resveratrol. All of them are one monomer resveratrol, resveratrol-12-C-glucopyranoside (**1**); three dimers resveratrol, (-)-ampelopsin A (**2**), laevifonol (**3**), diptoindonesin A (**4**); three trimers resveratrol, (-)- α -viniferin (**5**), Viniferol D (**6**), Pauciflorol B (**7**); and tetramers resveratrol, (-)-hopeaphenol (**8**). The structures of these compounds were determined on the basis of spectroscopic evidence.

Key words: Diversity Oligostilbenoids, *Shorea seminis*, resveratrol-12-C-glucopyranoside, (-)-ampelopsin A, laevifonol, diptoindonesin A, resveratrol, (-)- α -viniferin, Viniferol D, Pauciflorol B, resveratrol, (-)-hopeaphenol

1. Pendahuluan

Shorea seminis merupakan salah satu spesies dari tumbuhan genus *Shorea* yang lebih dikenal dengan meranti dan termasuk dalam famili Dipterocarpaceae. Tumbuhan ini merupakan pohon penghasil kayu yang sangat unggul kualitasnya dan terdapat sangat melimpah di hutan hujan tropis wilayah Indonesia terutama di Pulau Kalimantan (Newman, 1999). Pada kesempatan ini dibahas keragaman struktur dari 8 (delapan senyawa oligomer stilbenoid yang telah berhasil diisolasi dari tumbuhan *Shorea seminis* yang meliputi: suatu monomer turunan C-glukosida resveratrol, resveratrol-12-C-glukopiranosida (**1**); tiga dimer resveratrol,

diptoindonesin A (**2**), (-)-ampelopsin A (**3**) dan laevifonol (**4**); tiga trimer resveratrol, (-)- α -viniferin (**5**), viniferol D (**6**) dan pauciflorol B (**7**); serta suatu tetramer resveratrol, (-)-hopeaphenol (**8**).

2. Percobaan

Umum:

Pada percobaan ini, $[\alpha]_D$ diukur pada 589 nm menggunakan JASCO P-1020. Spectrum ¹H-NMR diukur menggunakan spektrometer JEOL J-400 (400 MHz), dengan menggunakan sinyal residu (¹H) sebagai standar. Kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom gravitasi (KKG), kromatografi kolom tekan (KKT), dan

kromatografi radial (KR), berturut-turut menggunakan silika gel Merck 60 GF₂₅₄ (230 - 400 mesh), silika gel 60 (35 - 70 mesh), silika gel 60 (200 mesh), dan silika gel 60 PF₂₅₄ (dengan ketebalan plat 0,5, 1, dan 2 mm). Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan pada pelat alumunium berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ 0,25 mm. Sebagai pereaksi penampak noda pada analisis KLT digunakan larutan serum sulfat dalam asam sulfat encer. Pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV dilakukan menggunakan larutan natrium hidroksida 2%.

Bahan penelitian :

Kulit batang *Shorea seminis* diperoleh dari kebun percobaan Darmaga, Bogor. Bogor, Jawa Barat, pada bulan September 2000. Identitas tumbuhan ditetapkan di Herbarium Bogoriensis, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor, Indonesia, dan spesimen ketiga spesies tumbuhan tersebut disimpan di Jurusan Biologi, FMIPA, ITB.

Cara Kerja :

1. Penyediaan bahan penelitian

Sampel tanaman yang berupa kulit batang *Senna multijuga* dibersihkan dari pengotornya, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Setelah itu dipotong-potong dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk.

2. Ekstraksi dan isolasi

Serbuk kulit batang *S. seminis* sebanyak 8 kg diekstraksi dengan metanol menggunakan teknik maserasi tiga kali berturut-turut @ 24 jam menghasilkan 200 g ekstrak metanol. Selanjutnya ekstrak MeOH dipartisikan, berturut-turut ke dalam *n*-heksan, diklorometan, dan etil asetat, sehingga diperoleh 15 g ekstrak *n*-heksan, 8 g ekstrak diklorometan, 60 g ekstrak etil asetat, dan 115 g ekstrak metanol sisa.

Sebagian dari ekstrak etil asetat (18 g) difraksinasi dengan cara kromatografi cair vakum (KCV) dengan eluen campuran diklorometan-aseton = 1 : 0 sampai 1 : 1 dan terakhir dicuci dengan metanol, menghasilkan empat fraksi utama masing-masing seberat 1,5; 7,2; 3,6; dan 4,0 g. Fraksi utama pertama (A = 1,5 g) difraksinasi lebih lanjut dengan cara KKG (eluen campuran *n*-heksan-etil asetat = 9 : 1 sampai 7 : 3) sehingga diperoleh empat fraksi gabungan. Fraksi gabungan keempat

selanjutnya dimurnikan dengan cara KKG (eluen diklorometan-aseton = 9 : 1) dan kromatografi radial (eluen *n*-heksan-kloroform-metanol = 4 : 6 : 1), menghasilkan (-)- α -**viniferin (5)** (325 mg) berupa serbuk berwarna kuning muda.

Fraksi utama kedua (B = 7,2 g) difraksinasi lebih lanjut dengan cara KCV (eluen campuran *n*-heksan-aseton = 3 : 1 sampai 1 : 1), menghasilkan empat fraksi gabungan masing-masing seberat 0,4; 1,1; 3,0; dan 2,0 g. Pemurnian lebih lanjut terhadap fraksi gabungan kedua (B₂ = 1,1 g) dengan berbagai cara kromatografi, yaitu KCV (eluen diklorometan-aseton = 95 : 5 sampai 8 : 2), kromatografi radial (eluen *n*-heksan-kloroform-metanol = 4 : 6 : 1), dan KKG (eluen *n*-heksan-kloroform-metanol = 4 : 6 : 1), menghasilkan tambahan (-)- α -**viniferin (5)** (475 mg). Pemurnian terhadap fraksi gabungan ketiga (B₃ = 3 g) dengan KCV (eluen diklorometan-aseton = 95 : 5 sampai 6 : 4), KKG (eluen kloroform-metanol = 9 : 1), dan tiga kali KKT (berturut-turut menggunakan eluen *n*-heksan-aseton = 6 : 4, *n*-heksan-etil asetat = 5 : 4, dan diklorometan-aseton = 8 : 2), menghasilkan (-)-**ampelopsin A (3)** (30 mg) berupa serbuk berwarna kuning muda. Selanjutnya fraksi gabungan keempat (B₄ = 2 g) dimurnikan dengan beberapa cara kromatografi, yaitu KCV (eluen *n*-heksan-etil asetat = 4 : 6), KKT (tiga kali pengerjaan dengan eluen diklorometan-aseton = 4 : 1, diklorometan-metanol = 94 : 6, dan kloroform-metanol = 92,5 : 7,5), dan dengan kolom shepadeks (eluen metanol) menghasilkan **laevifonol (4)** (40 mg) berupa serbuk berwarna putih.

Senyawa **laevifonol (4)** (100 mg) diperoleh pula dari hasil pemurnian fraksi utama ketiga dengan menggunakan metoda pemurnian sebagaimana yang dilakukan terhadap pemurnian fraksi gabungan keempat dari fraksi utama kedua. Selain itu, pada pemurnian fraksi gabungan keempat dari fraksi utama kedua dan fraksi utama ketiga diperoleh pula suatu padatan berwarna kuning muda yang dikristalkan dalam metanol-kloroform menghasilkan (-)-**hopeafenol (8)** (200 mg) sebagai serbuk berwarna kuning muda.

Fraksi utama keempat (D = 4,0 g) dimurnikan dengan beberapa cara kromatografi, yaitu KCV (eluen campuran *n*-heksan-etil asetat = 9 : 1

sampai 0 : 1 dan terakhir dengan eluen campuran etil asetat-metanol = 9 : 1), KKT (eluen etil asetat-*n*-heksan = 8 : 2), dan kromatografi radial (dua kali pengerjaan dengan eluen kloroform-metanol = 87,5 : 12,5 dan 88 : 12) menghasilkan **diptoindonesin A (2)** (55 mg) berupa serbuk berwarna putih.

Sisa ekstrak etil asetat (42 g) dilarutkan kembali dalam aseton dan bagian yang terlarut (25 g) selanjutnya difraksinasi dengan KCV (eluen *n*-heksan-etil asetat = 3 : 1 sampai 0 : 1) menghasilkan tiga fraksi utama masing-masing seberat 1, 3, dan 10 g. Fraksi utama ketiga (D = 10 g) dimurnikan lebih lanjut dengan KCV (eluen diklorometan-metanol = 9 : 1 sampai 8 : 2), diikuti kolom shepadeks (eluen metanol), menghasilkan dua fraksi (FI dan FII). Fraksi pertama (FI) dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi radial (eluen etil asetat-kloroform-metanol-air = 12 : 8 : 4 : 0,2), menghasilkan **resveratrol-12-C-glukopiranosida (1)** (10 mg), berupa kristal jarum berwarna putih. Sedangkan fraksi kedua (FII) dimurnikan lagi dengan dua kali kromatografi kolom tekan dan tiga kali kromatografi radial dengan eluen masing-masing diklorometan-metanol (85:15), diklorometan-metanol (87,5:12,5), etil asetat-kloroform-metanol-H₂O (15:8:11:0,5), etil asetat-kloroform-metanol-H₂O (15:10:3:0,5), dan etil asetat-kloroform-metanol-H₂O (15:10:3:0,5). Oleh karena hasil yang diperoleh belum juga murni, selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan menggunakan eluen metanol-air (1:1). Dari proses ini diperoleh dua senyawa yaitu viniferol D (6), berupa serbuk berwarna putih seberat 1 mg dan pauciflorol B (7) berupa serbuk berwarna putih seberat 1,7 mg.

3. Hasil dan Pembahasan

Delapan senyawa telah berhasil diisolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang *S. seminis*, yaitu suatu monomer turunan C-glukosida resveratrol, resveratrol-12-C-glukopiranosida (1); tiga dimer resveratrol, diptoindonesin A (2), (-)-ampelopsin A (3) dan laevifonol (4); tiga trimer resveratrol, (-)- α -viniferin (5), viniferol D (6) dan pauciflorol B (7); serta suatu tetramer resveratrol, (-)-hopeafenol (8). Struktur senyawa-senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan analisis data fisik dan spektroskopi UV, IR, ¹H dan ¹³C NMR termasuk 2D COSY, HMQC, HMBC, dan NOESY. Penentuan

struktur molekul kedelapan senyawa, telah dipublikasikan sebelumnya (Aminah, 2001; Aminah, 2003; Aminah, 2003; Aminah, 2004). Struktur molekul delapan senyawa hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 1.

Ditinjau dari strukturnya, kedelapan senyawa hasil isolasi merupakan turunan dari resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) dengan variasi yang cukup beragam. Monomer resveratrol tidak berhasil ditemukan namun diperoleh dalam bentuk glikosidanya yaitu resveratrol-12-C-glukopiranosida (1) dan senyawa ini diperoleh pada fraksi yang cukup polar.

Tiga dimer resveratrol yang ada cukup unik, meskipun ketiga senyawa tersebut berasal dari prekursor yang sama yaitu suatu dimer stilben yang dikenal dengan nama ϵ -viniferin, namun masing-masing senyawa terbentuk dari proses yang berbeda. Diptoindonesin A (2) merupakan unit ϵ -viniferin yang mengikat unit glukosa pada C_{12b}, (-)-ampelopsin A (3) diperoleh dari proses siklisasi dari unit ϵ -viniferin. Sedangkan laevifonol merupakan unit ϵ -viniferin yang mengikat asam askorbat (Vit C) pada bagian stilben bebasnya.

Viniferol D (6) dan pauciflorol B (7) adalah dua trimer resveratrol yang memiliki satu unit cincin dihidrobenzofuran dan merupakan isomer satu dengan yang lainnya. Sedangkan (-)- α -viniferin (5) merupakan trimer resveratrol yang memiliki tiga unit cincin dihidrobenzofuran. Perbedaan ketiga trimer resveratrol ini diduga disebabkan oleh pola siklisasi dan kopling oksidatif yang berbeda.

Satu-satunya tetramer yang berhasil diperoleh dari *S. seminis* dan merupakan komponen mayor adalah (-)-hopeafenol (8). Senyawa ini diduga merupakan hasil kopling oksidatif dari dua unit dimer resveratrol yang juga berhasil diisolasi pada spesies ini, yaitu (-)-ampelopsin A (3).

Dengan dilaporkannya kedelapan senyawa dari *S. seminis* ini, maka dapat diusulkan hubungan biogenesisnya seperti terlihat pada Gambar 2.

4. Kesimpulan

- Delapan senyawa resveratrol-12-C-glukopiranosida, (-)-ampelopsin A, laevifonol, diptoindonesin A, (-)- α -viniferin, Viniferol D, Pauciflorol B, dan (-)-hopeaphenol telah berhasil diisolasi dari *Shorea seminis*.

Nanik Siti Aminah, Sjamsul Arifin Achmad , Masatake Niwa, Yana Maolana Syah, Mariko Kitajima, Euis Holisotan Hakim

- Senyawa hasil isolasi terdiri atas empat kelompok, monomer, dimer, trimer, dan tetramer resveratrol. Newman, M.F., P.F. Burges, T.C. Whitmore (1999), *Pedoman identifikasi Pohon Dipterocarpaceae Pulau Kalimantan*, Prosea Indonesia, Bogor
- Struktur senyawa cukup beragam, ditinjau dari bentuk kerangka, pola polimerisasi dan substituen yang terikat pada kerangka tersebut.
- Kedelapan senyawa berasal dari satu prekursor yang sama, yaitu suatu unit monomer yang dikenal dengan nama resveratol (3,5,4'-trihidroksistilben)

5. Daftar Pustaka

Aminah, N.S., S. A. Achmad, N. Aimi, E. H. Hakim, Y. M. Syah, L. Makmur, L. D. Juliawaty, M. Kitajima, D. Mujahidin, and H. Takayama, 2001, Oligomer Stilbenoids: Ampelopsin A, (-)- α -Viniferin, and Hopeaphenol from *Shorea seminis* V.Sl. (Dipterocarpaceae), *Oral Presentation*, Collective Abstracts, 3th International Seminar On Tropical Rainforest Plants and Their Utilization for Development, Padang, Indonesia, October 23-24

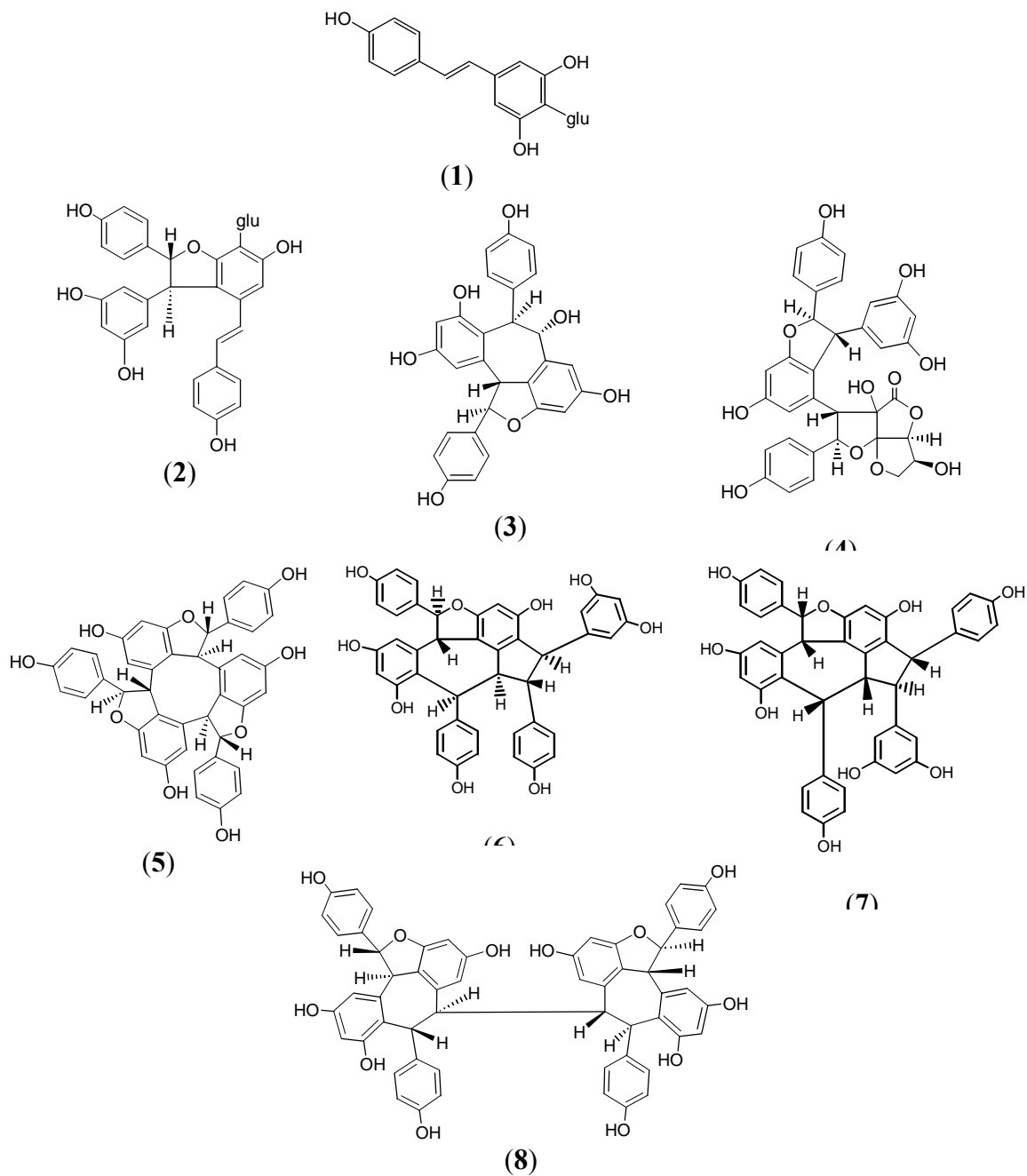
Aminah, N.S., S. A. Achmad, N. Aimi, E. H. Hakim, M. Kitajima, Y. M. Syah, and H. Takayama, 2002, Diptoindonesin A, A New C-glucoside of ϵ -viniferin from *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae), *Fitoterapia*, **73**, 501-507

Aminah, N.S., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, L. D. Juliawaty, dan E. L. Ghisalberty, 2002, Laevifonol, Diptoindonesin A, dan Ampelopsin A, Tiga dimer stilbenoid dari Kulit Batang *Shorea seminis* V. Sl. (Dipterocarpaceae), *Journal Matematika dan Sains*, **8**, 31-34

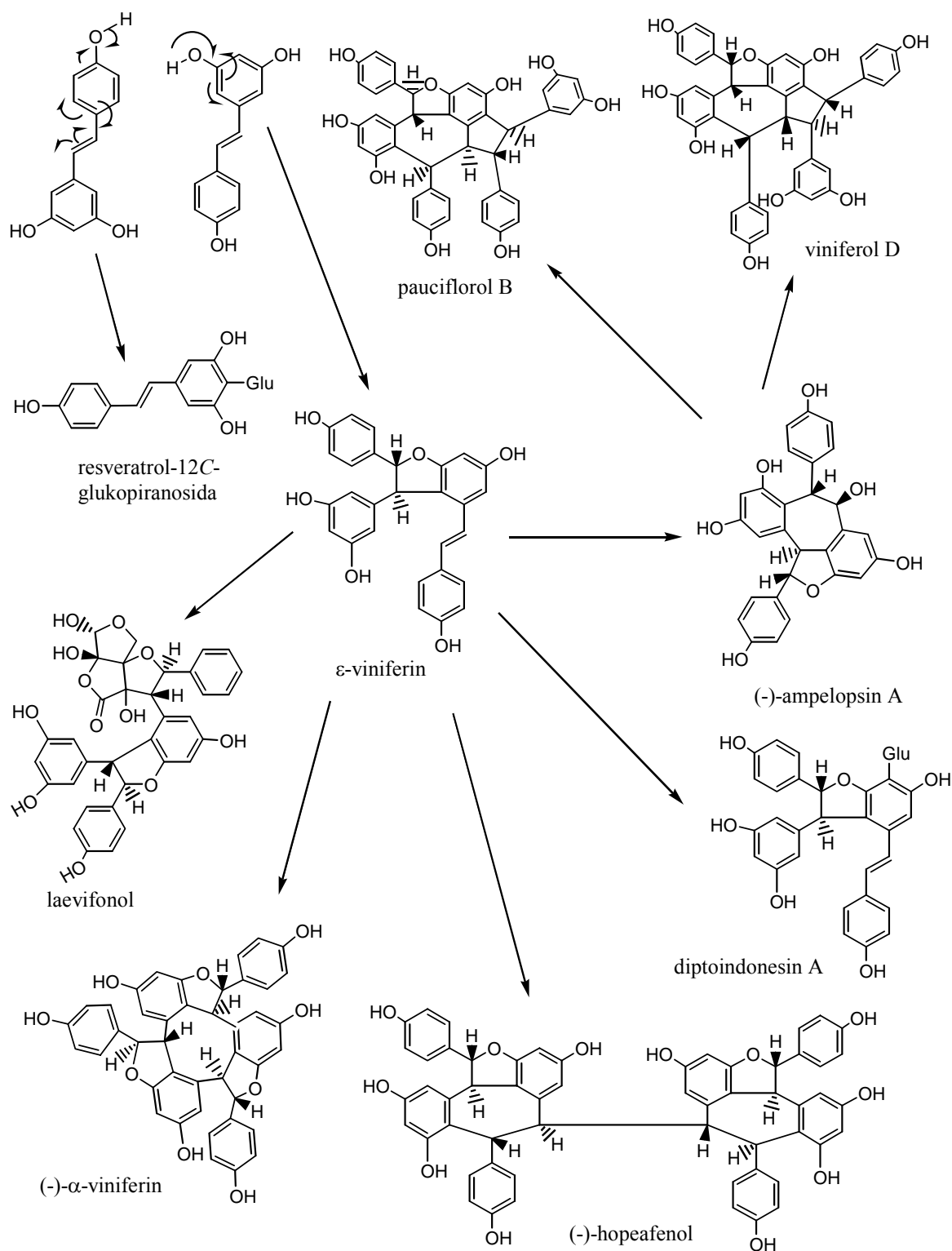
Aminah, N. S., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, L. D. Juliawaty, and E. L. Ghisalberty, 2002, (-)- α -Viniferin, Suatu Trimer Stilbenoid dari Kulit Batang *Shorea seminis* V. Sl. (Dipterocarpaceae), Presentasi oral, Kumpulan Abstrak, Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia, Bandung, 28-29 Mei 2002

Aminah, N. S., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, L. D. Juliawaty, and E. L. Ghisalberty, dan M. Kitajima, 2003, Beberapa Senyawa Oligostilbenoid dari Kulit Batang *Shorea seminis* V. Sl. (Dipterocarpaceae), **Presentasi Oral**, Kumpulan Abstrak, Simposium Nasional HKBAI, Bandung, 10-19 Pebruari

Aminah, N. S., S. A. Achmad, E. H. Hakim, Y. M. Syah, M. Niwa, K. Terashima, He Yue-Hua, 2004, Viniferol D dan Pauciflorol B, Dua Senyawa Trimer Stilbenoid dari *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae), Simposium Nasional HKBAI, Bandung, Desember



Gambar 1. Struktur senyawa hasil isolasi dari *Shorea seminis*



Gambar 2. Hubungan biogenesis senyawa hasil isolasi dari kulit batang *S. seminis*

Ekstraksi Cu^{2+} Dalam Larutan NaCl Menggunakan Teknik Membran Cair Emulsi Sistem Aliran Semikontinu

Nikmans Hattu¹⁾

1) Jurusan Kimia, Universitas Pattimura
Ambon, Indonesia

Abstrak

Ekstraksi semikontinu ion logam Cu^{2+} dalam larutan NaCl 6000 ppm dengan membran cair emulsi telah dilakukan menggunakan alat mixer-settler. Membran cair emulsi yang digunakan dibuat dengan melarutkan asam di-(2-etilheksil) fosfat (D2EHPA) sebagai senyawa pembawa dalam kerosen. Kondisi optimum pemisahan yang diperoleh yakni perbandingan kecepatan alir fasa emulsi dan fasa eksternal 1:4 dan waktu keadaan tunak dimulai pada menit ke-10. Tingkat pemisahan ion logam Cu^{2+} dalam larutan NaCl 6000 ppm pada kondisi optimum adalah 65,48% untuk pengukuran pada fasa internal selama 10 menit pertama dan rata-rata 70,04% untuk pengukuran dalam rafinat setiap interval waktu 10 menit. Hasil ekstraksi dengan sistem semikontinu untuk prekonsentrasi menggunakan zat pembawa D2EHPA 6% dan pengemulsi sorbitan monooleat (span-80) 4%, didapatkan kenaikan konsentrasi ion logam Cu^{2+} rata-rata dalam fasa internal sebesar 0,775 ppm/10 menit dan faktor prekonsentrasi ion logam Cu^{2+} dalam larutan NaCl diperoleh 2,05 setelah 100 menit proses ekstraksi berlangsung. Hasil penelitian menunjukkan membran cair emulsi dengan zat pembawa D2EHPA dan pengemulsi sorbitan monooleat mempunyai kinerja yang cukup baik pada sistem semikontinu, walaupun untuk tujuan prekonsentrasi dengan waktu ekstraksi yang relatif lama, faktor kestabilan emulsi perlu diperhatikan.

Paper is not available



Pengaruh pengerjaan kitosan dan asam sitrat pada kain kapas terhadap sifat fisik kain

Noerati

Departemen Kimia ITB, Jl. Ganesha No. 10 Bandung

Abstrak

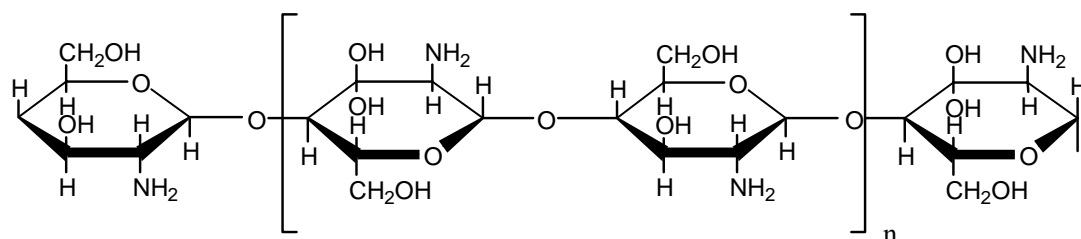
Kapas saat ini masih merupakan salah satu serat yang terpenting karena mempunyai absorpsi yang tinggi sehingga nyaman dipakai. Salah satu kelemahan serat kapas adalah ketahanan kusut yang rendah. Esterifikasi kapas dengan asam sitrat dapat meningkatkan ketahanan kusut kapas tetapi menurunkan absorpsi bahan kapas. Penelitian ini bermaksud mengatasi menurunnya absorpsi kapas akibat proses esterifikasi dengan melakukan pengerjaan pendahuluan (pretreatment) sebelum proses esterifikasi. Pengerjaan pendahuluan yang dilakukan adalah proses rendam peras kain kapas dengan larutan kitosan dengan konsentrasi 0,5 g/L sampai 3 g/L dengan selang 0,5. Selanjutnya proses esterifikasi dilakukan dengan mengerjakan kain kapas dengan asam sitrat dan katalis natrium hipoposfit pada suhu 170 °C dan waktu pemanas awetan 60 detik. Dari hasil percobaan dilakukan pengujian kekuatan tarik, ketahanan kusut dan daya serap terhadap zat warna reaktif. Pengujian dilakukan dengan membandingkan kain hasil proses pretreatment yang diikuti dengan esterifikasi dengan kain standard dan kain hasil proses pretreatment tanpa diikuti proses esterifikasi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan daya serap terhadap zat warna reaktif semakin tinggi. Pada proses yang diikuti dengan esterifikasi menghasilkan kain dengan ketahanan kusut kekuatan tarik kain dan ketahanan luntur zat warna yang lebih baik daripada kain yang tidak dilakukan esterifikasi. Penggunaan kitosan dengan 2,5 g/L menghasilkan kain dengan daya absorpsi mendekati kain standard dan ketahanan kusut serta kekuatan yang lebih baik dari kain standard. Kondisi optimum ditetapkan pada penggunaan kitosan 2,5 g/L.

Kata kunci ; Kitosan, asam sitrat, esterifikasi, tahan kusut, absorpsi

1. Pendahuluan

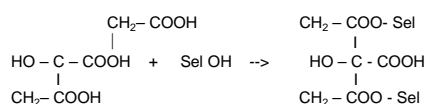
Kapas sampai saat ini masih merupakan tekstil sandang terpenting dengan segala kelebihan dan kekurangannya. Salah satu kekurangan kapas adalah ketahanan kusutnya yang rendah. Berbagai usaha dilakukan untuk mengatasi masalah ketahanan kusut kapas tersebut, salah satunya adalah yang dikenal dengan proses resinasi menggunakan resin tahan kusut. Untuk mengatasi kekusutan pada

bahan kapas dilakukan dengan penyempurnaan anti kusut menggunakan resin turunan N metylol yang dapat mengadakan ikatan silang dengan serat kelemahan resin ini umumnya menghasilkan formaldehid bebas yang mengganggu kesehatan, oleh karena itu salah satu alternatif resin antikusut yang tidak menghasilkan formaldehid bebas diantaranya esterifikasi dengan senyawa turunan karboksilat⁽¹⁾.



Gambar 1 Struktur molekul kitosan

Proses esterifikasi pada kain kapas bertujuan untuk memberikan ikatan silang antar rantai molekul selulosa dengan ikatan ester. Dengan adanya ikatan silang ini diharapkan dapat memperbaiki ketahanan kusut dari kapas. Zat yang digunakan sebagai zat pengikat silang adalah asam sitrat. Adanya 3 buah gugus fungsi karboksilat dari asam sitrat diharapkan akan mengadakan ikatan silang antar rantai selulosa pada dua gugus fungsi.



Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian esterifikasi kapas dengan asam sitrat⁽²⁾. Esterifikasi kapas dengan asam sitrat dapat memperbaiki ketahanan kusut kain, tetapi menyebabkan menurunnya daya absorpsi terhadap zat warna maupun kelembaban. Pada penelitian ini bermaksud mengatasi menurunnya absorpsi kain terhadap zat warna maupun kelembaban akibat proses esterifikasi kapas dengan asam sitrat. Penelitian dilakukan dengan cara melakukan proses pendahuluan (pre treatment) dengan kitosan sebelum proses esterifikasi.

Kitosan sendiri merupakan polisakarida yang mengandung gugus amina pada posisi 2. Dalam dunia pertekstilan senyawa ini banyak digunakan diantaranya sebagai zat untuk meningkatkan daya absorpsi kain^(4,5). Hal ini disebabkan banyaknya gugus hidroksil dan gugus amina yang dimiliki kitosan.

Pengerjaan pendahuluan dengan larutan kitosan pada kain yang akan mengalami proses esterifikasi diharapkan dapat meningkatkan absorpsi kain terhadap zat warna maupun kelembaban, sehingga menurunnya daya absorpsi akibat proses esterifikasi dapat diatasi.

2. Percobaan

Bahan :

Bahan yang digunakan adalah kain kapas dengan kondisi telah dihilangkan zat pengotor bukan serat (lemak, lilin kadar abu dan pigmen alam) dengan proses scouring menggunakan NaOH dan H₂O₂ secara simultan.

Kitosan yang digunakan merupakan hasil proses isolasi kitin dari limbah udang yang telah mengalami proses deasetilasi, dengan derajat deasetilasi 78 %.

Asam sitrat dan katalis Natriumhipofosfit yang digunakan grade pa dari Merck

Zat Warna Reaktif Blue digunakan untuk mencelup kain hasil proses esterifikasi.

Percobaan :

Percobaan dilakukan dalam dua tahap yaitu :

Melakukan proses rendam peras kain kapas dengan larutan kitosan dengan beberapa variasi konsentrasi : 0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 g/L. Selanjutnya dilakukan pengeringan pada temperatur 100 °C selama 2 menit.

Kain yang telah melalui perlakuan dengan kitosan dilakukan proses esterifikasi dengan asam sitrat 50 g/L dengan metoda rendam peras kemudian setelah pengeringan dilakukan proses pemanas awetan (Curing) pada temperatur 170 °C selama 60 detik. Pengerjaan selanjutnya adalah mencelup kain hasil proses pengerjaan kitosan dan asam sitrat dengan zat warna reaktif dengan konsentrasi 3 %

Pengujian

Pengujian dilakukan dengan membandingkan tiga jenis kain yaitu kain standard sebagai pembanding, kain yang mengalami proses pre-treatment dan esterifikasi serta kain yang hanya mengalami proses pre-treatment tanpa proses esterifikasi. Pengujian yang dilakukan meliputi pengujian kekuatan tarik kain, ketahanan kusut bahan, daya absorpsi terhadap zat warna reaktif

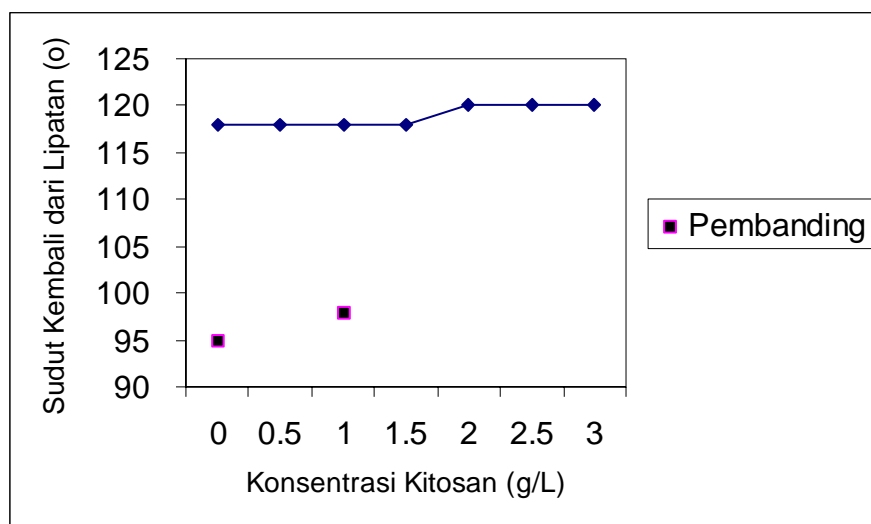
dan ketahanan luntur warna. Untuk memastikan terbentuknya reaksi esterifikasi dilakukan penentuan struktur dengan spektroskopi Infra merah.

3. Hasil Dan Pembahasan

Ketahanan kusut kain

Untuk mengetahui ketahanan kusut kain dilakukan pengujian sudut kembali dari lipatan sesuai dengan SII No 0122-75 yang disajikan gambar 2

menurut standar SII menunjukkan sifat ketahanan kusut yang cukup baik. Peningkatan nilai ketahanan kusut ini kemungkinan disebabkan adanya ikatan silang yang terbentuk antara selulosa oleh asam sitrat. Hal ini dapat dibuktikan dengan pengujian menggunakan spektroskopi Infra Merah. Kenaikkan konsentrasi kitosan ternyata tidak terlalu berpengaruh terhadap kenaikan nilai sudut kembali dari lipatan. Hal ini dapat dilihat dari perbedaan nilai sudut kembali dari lipatan yang



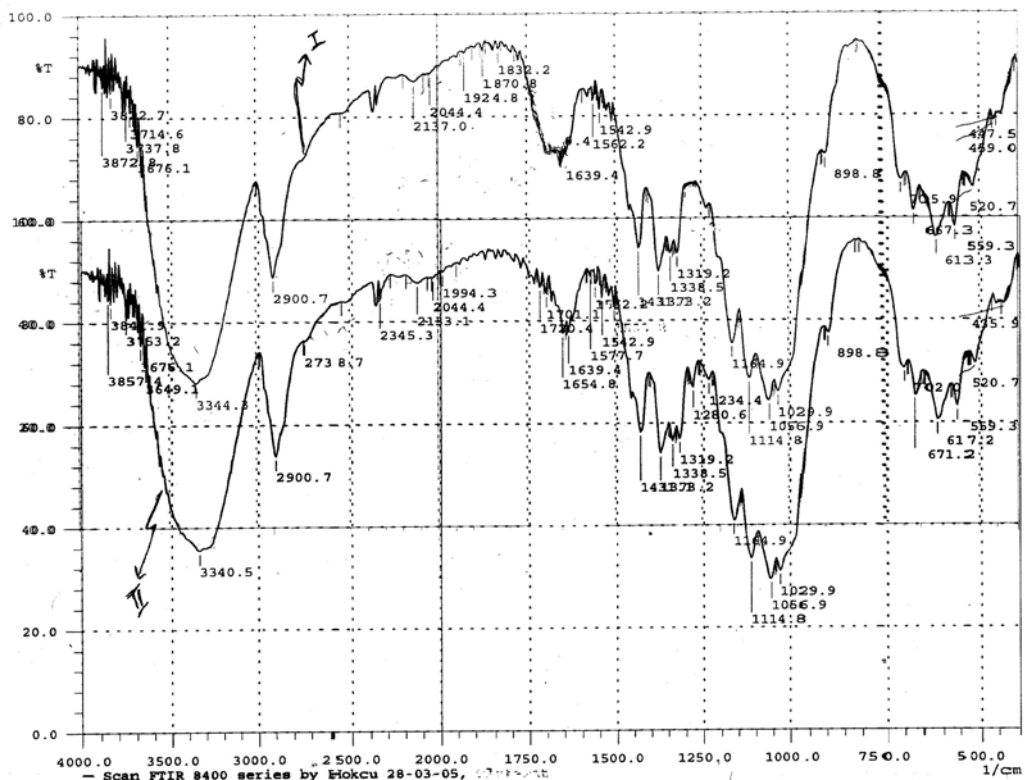
Keterangan :Pembanding :Kain standar : kain tanpa perlakuan (blanko) Sudut Kembali = 95 °
Kain 1 : kain mengalami perlakuan pre-treatment kitosan 3 g/L, tanpa esterifikasi sudut kembali = 98 °
Gambar 2

Dari pengujian terhadap hasil percobaan menunjukkan bahwa proses esterifikasi akan menaikkan ketahanan kusut kain kapas dalam hal ini ditunjukkan dengan kenaikan sudut kembali dari lipatan dibandingkan kain standar (blanko). Pada kain yang mengalami perlakuan dengan kitosan tanpa diikuti dengan esterifikasi peningkatan sudut kembali dari lipatan dibandingkan dengan blanko relatif kecil, hal ini menggambarkan bahwa tidak terjadi perubahan yang berarti dari ketahanan kusut bahan tekstil. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada kain yang mengalami proses esterifikasi dengan asam sitrat setelah pengerjaan dengan kitosan. Pada kain tersebut mengalami kenaikan sudut kembali dari kekusutan dibandingkan kain standar maupun dengan kain yang mengalami perlakuan dengan kitosan tanpa diikuti proses esterifikasi. Kain yang mengalami proses esterifikasi dengan asam sitrat mempunyai nilai sudut kembali dari lipatan minimal sebesar 118, nilai tersebut

relatif kecil.

Proses Esterifikasi

Untuk memastikan terjadinya proses esterifikasi dapat dilakukan dengan pengujian gugus fungsi menggunakan spektroskopi infra merah. Pengujian dengan spektroskopi infra merah diprioritaskan untuk memeriksa adanya gugus karbonil yang terletak pada bilangan gelombang 1600 sampai 1720 cm^{-1} , dengan adanya konyugasi akan memberikan pergeseran lebih kecil sekitar 20 cm^{-1} . Adanya karbonil pada ester ditunjukkan dengan munculnya puncak serapan selain pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} sampai 1720 cm^{-1} juga terdapat serapan pada daerah bilangan gelombang 1200 cm^{-1} sampai 1300 cm^{-1} . Untuk karbonil karboksilat puncak serapan terdapat pada bilangan gelombang 1400 cm^{-1} sampai 1520 cm^{-1} , sedangkan karbonil dari amida ditunjukkan dengan munculnya puncak serapan pada bilangan gelombang 1625 - 1680 cm^{-1} .



Keterangan : I = Spektrum IR kain hasil pengerjaan kitosan tanpa esterifikasi dengan asam sitrat
 II = Spektrum IR kain hasil pengerjaan kitosan dilanjutkan dengan proses esterifikasi dengan asam asetat
 Gambar 3

Spektrum IR dari kain yang mengalami pretreatment dengan kitosan saja menunjukkan adanya serapan karbonil amida terjadi pada bilangan gelombang 1639. Pada spektrum tersebut tidak terlihat adanya serapan karbonil dari ester. Pada spectrum IR kain yang mengalami pretreatment dengan kitosan kemudian diikuti pengerjaan dengan asam sitrat muncul adanya serapan karbonil dari ester pada bilangan gelombang 1701, dan 1234. Dari data spectrum tersebut dapat dibuktikan adanya reaksi esterifikasi pada kain yang mengalami pretreatment dengan kitosan dan dilanjutkan dengan pengerjaan asam sitrat.

Dengan terbentuknya ikatan ester antara gugus karboksilat dengan gugus hidroksil akan terbentuk ikatan silang diantara molekul selulosa dan kitosan sehingga mampu mempertahankan posisi ikatan ketika dikenai gaya deformasi(misalnya lipatan) sehingga ketika gaya dihilangkan akan kembali ke bentuk semula atau dikatakan tahan kusut.

Kekuatan Tarik kain

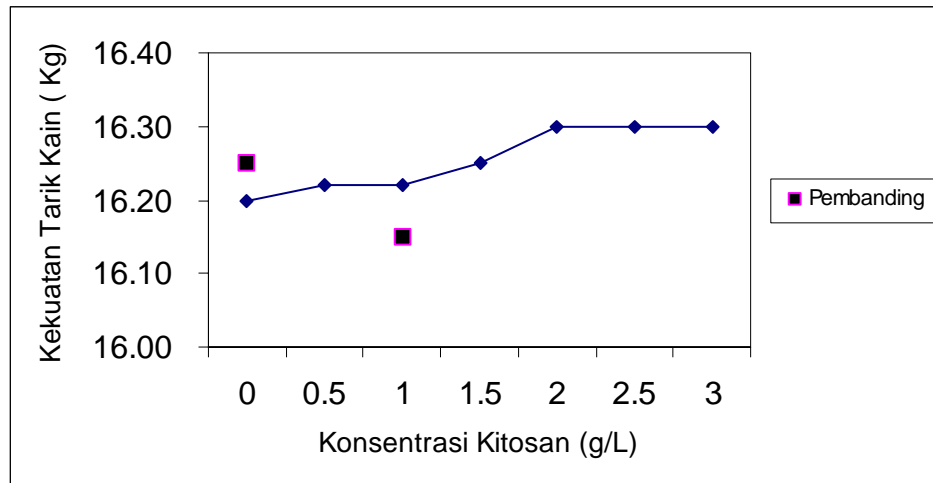
Suhu yang terlalu tinggi memungkinkan terjadinya kerusakan serat dengan terbukanya

rantai molekul selulosa membentuk gugus aldehid atau karboksilat, jika berlanjut akan menyebabkan penurunan kekuatan, kendatipun demikian jika pengontrolan suhu dan waktu pengerjaan dikombinasikan dengan baik kerusakan serat akan dapat dihindari⁽⁵⁾.

Pada pengujian kekuatan tarik kain yang dilakukan sesuai dengan SII no 0106-75 tidak terdapat perubahan kekuatan tarik kain yang berarti karena adanya proses perlakuan kitosan maupun esterifikasi. Pada proses pengerjaan dengan kitosan tanpa esterifikasi terdapat penurunan kekuatan tarik kain, hal ini disebabkan perlakuan panas yang dialami kain kapas pada saat proses pengerjaan dengan kitosan. Hasil Pengujian kekuatan tarik disajikan pada gambar 4 berikut.

Pada proses pengerjaan kitosan yang diikuti dengan esterifikasi terdapat kenaikan kekuatan tarik kain. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun terjadi penurunan kekuatan akibat pengerjaan panas pada bahan kapas, tetapi dengan adanya ikatan silang akan mengurangi efek penurunan kekuatan tersebut, sehingga

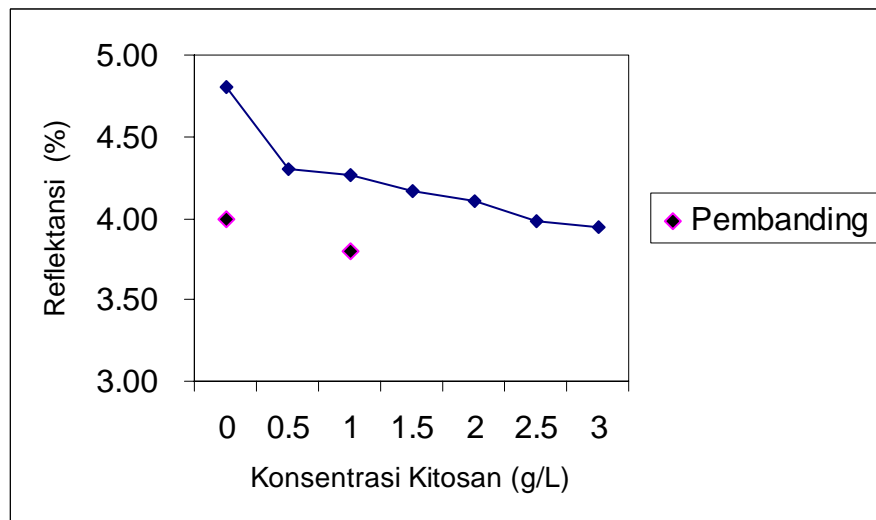
Noerati



Keterangan : Pemanding Kain standar : kain tanpa perlakuan (blanko) Kekuatan Tarik 16,25 Kg

Kain 1 : kain dengan perlakuan pre-treatment kitosan 3 g/L, tanpa esterifikasi, Kekuatan Tarik = 16,15 Kg

Gambar 4



Keterangan :Pemanding :Kain standar : kain tanpa perlakuan (blanko) % R = 4,0

Kain 1 : kain dengan perlakuan pre-treatment kitosan 3 g/L, tanpa esterifikasi % R = 3,80

Gambar 5

penurunan kekuatan dari kain standar relatif kecil.

Ketuaan warna hasil celupan

Pada hasil proses esterifikasi dilakukan proses pencelupan dengan menggunakan zat warna reaktif. Pengukuran ketuaan warna hasil pencelupan ditunjukkan dengan nilai persen reflektansi yang diukur pada panjang gelombang maksimal 620 nm. Hasil pengujian disajikan pada gambar 5.

Hasil pengukuran ketuaan warna menunjukkan adanya perbedaan antara kain standar dengan kain yang mengalami pengerjaan kitosan. Kain yang mengalami pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan dengan asam sitrat

menunjukkan % R yang lebih kecil dari kain standar, hal ini menunjukkan ketuaan warna yang lebih besar. Kain yang tidak mengalami pengerjaan dengan kitosan tetapi langsung mengalami pengerjaan dengan asam sitrat ketika dicelup menghasilkan reflektansi yang lebih besar dari kain standar, artinya warna lebih muda dari kain standar, hal ini disebabkan adanya ikatan silang antara rantai selulosa menyebabkan absorpsi yang relatif lebih rendah sehingga menghasilkan warna celupan yang relatif lebih muda.. Kain yang mengalami pengerjaan dengan kitosan dan dilanjutkan dengan esterifikasi menunjukkan perubahan nilai reflektansi.

Pada gambar 5 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan % R semakin kecil artinya ketahanan warna cenderung meningkat. Pada konsentrasi kitosan 2,5 g/L ketahanan warna mendekati ketahanan warna kain standar.

Ketahanan Luntur Warna

Pengujian ketahanan luntur warna dilakukan sesuai dengan SII No 0115 –75 menunjukkan kain yang diproses dengan kitosan kemudian dilanjutkan dengan asam sitrat mempunyai

peningkatan ketahanan kusutnya relatif kecil

- Pengerjaan Kapas dengan Kitosan yang diikuti dengan pengerjaan asam sitrat menunjukkan terjadinya reaksi esterifikasi, sedangkan pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan asam sitrat reaksi esterifikasi tidak terjadi.
- Pengerjaan Kapas dengan Kitosan yang diikuti dengan pengerjaan asam sitrat

Tabel 1
Hasil Pengujian Ketahanan Luntur Warna Terhadap Pencucian

Konsentrasi Kitosan (g/L)	Skala Perubahan	Skala Penodaan
Kain standar	4 – 5	4
Kain 1	3 – 4	3 – 4
0	4 – 5	4
0,5	4 – 5	4
1	4 – 5	4
1,5	4 – 5	4
2	4 – 5	4
2,5	4 – 5	4
3	4 – 5	4

Keterangan :Pembanding :Kain standar : kain tanpa perlakuan (blanko)

Kain 1 : kain dengan perlakuan pre-treatment kitosan 3 g/L, tanpa esterifikasi

ketahanan luntur terhadap pencucian yang lebih baik daripada kain yang mengalami pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan dengan asam sitrat seperti yang disajikan pada table 1 Hal ini menunjukkan bahwa pada pengerjaan kain dengan kitosan dapat menaikkan ketahanan warna kain. Kondisi ini disebabkan kitosan yang menempel pada permukaan serat kapas tidak mempunyai ikatan kimia dengan kain kapas, tetapi hanya ikatan fisik yang mudah lepas kembali, sehingga pada saat proses pencucian zat warna yang terikat oleh kitosan akan

4. Kesimpulan

- Pengerjaan kapas dengan asam sitrat dapat menaikkan ketahanan kusut kain, tetapi menurunkan absorpsi terhadap zat warna.
- Pengerjaan Kapas dengan Kitosan yang diikuti dengan pengerjaan asam sitrat dapat menaikkan ketahanan kusut kain, sedangkan pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan asam sitrat

dapat sedikit menaikkan kekuatan tarik kain, sedangkan pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan asam sitrat terjadi penurunan kekuatan tarik kain.

- Pengerjaan Kapas dengan Kitosan yang diikuti dengan pengerjaan asam sitrat dapat menaikkan ketahanan warna, sedangkan pengerjaan kitosan tanpa diikuti pengerjaan asam sitrat terjadi peningkatan ketahanan warna tetapi mempunyai ketahanan luntur relatif rendah
- Kondisi Optimum Pengerjaan adalah pada konsentrasi kitosan 2,5 g/L

5. Daftar Pustaka

1. Andrew,etal. Fabric Whiteness Retention in Durable Press Finishing with Citric Acid Textile Chemist and Colourist, 1993
2. Andri M Azis, Noerati Pengaruh esterifikasi kain kapas dengan asam sitrat terhadap sifat fisik kain. Laporan penelitian tugas akhir STTT 1997

Noerati

3. Hendrodyantopo dkk, Teknologi Penyempurnaan Sekolah Tinggi Teknologi Tekstil 1998.
4. Oktem Tulin Surface Treatment of Cotton Fabric with Chitosan Color.Technol,119 (2003)
5. Stephen David, Improving dye ability of wool by treatment with chitosan. JSDC Jan 1994
6. Sudjadi, Penentuan Struktur Senyawa Organik Universitas Gajah Mada 1981

Crystallography in Japan

Nobuo Tanaka

Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta 4259, Yokohama 226-581, Japan

Abstrak

There are a lot of crystallographers in Japan, who have studied in the physics, mineralogy, chemistry, biochemistry, and molecular biology including proteins and nucleic acids. Especially, many biologically reports have been submitted in the structural journals.

In the laboratory, the X-ray is generated with the target made of metal by the collision of the high energy electrons accelerated with the high tension. In Japan, a rotating anode generator is quite popular, which is a quite powerful device in the laboratory. By rotating the target at high speed, it is designed so that the thermal load may be made to disperse in the whole surface of the target. We use the machine which is operated at 6kW with the focus size of $0.3 \times 0.8 \text{ mm}^2$.

The other progress on the X-ray diffraction is the development of the area detector which installs either CCD or IP. It is quite useful to gather many diffractions quite quickly, especially from protein crystals. If you operate it skillfully, you will get a lot of diffractions until the high resolution in a day.

Strong and brilliant X-ray in Japan is obtained with SRs which were constructed at Tsukuba and Hyogo, respectively. When the electrons are accelerated to around velocity of light, they radiate lights whose wavelength is distributed from x-ray to ultraviolet ray, depending on the added tension. Although the light must be monochromatic by mirror and crystals prior to the experiment, it becomes quite easy and automatic to get the necessary beam with the skillful computer program. The machine is quite expensive and two Institutes can be operated in Japan. To use the instrument in each institute, we have to submit the proposal to each Institute. Each review committee is discussed whether the proposal is accepted. If accepted, the schedule on the machine time is fixed to prepare the sample.

Protein crystallography is one of the most active research field in Japan, because the government put much money for structural and genomic project. It is a goal of Japan to decide the structure of 3000 proteins until 2007. Crystallographers promote this project in cooperation with many researchers in the field of biochemistry and molecular biology. Apart from the popular hydrophilic proteins, some structures of membrane proteins like cytochrome oxidase have been solved. The disease related proteins are also important target to elucidate the relation between the structure and function of the protein. The research, however, advances quite slowly, because the disease related proteins are very difficult to purify for crystallization. Our recent structure of the protease from Norvirus is one of exciting result in this field.

Some researchers in the chemistry and protein crystallography are interesting about the dynamical structure of molecules. I hope that the molecule can be drawn from the process of the chemical reactions.

Tindakbalas Sinamoil Isotiosianat Dengan Analin Dan Morfolietilamina

Noor Azilah M Kasim, Ibrahim N.Hasan dan Bohari M Yamin

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor, Malaysia.
e-mail: azilalkasim@yahoo.co.uk
e-mail: bohari@pkriscc.ukm.my
e-mail: ibraqi04@yahoo.com

Abstrak

Sinamoil klorida dan sinamoil isotiosianat mudah mengalami hidrolisis menghasilkan asid sinamoilkarboksilat dan ammonium sinamoilkarboksilat. Dalam keadaan terkawal tindak balas dengan morfolinetilurea dapat menghasilkan 1-(2-morfolin-4-il-etil)-3-(3-fenil-akrilil)-tiourea [1]. Ia mempunyai sistem hablur triklinik dengan kumpulan ruang P-1, $a=6.1452(14)$, $b=9.731(2)$ dan $c=14.690(3)\text{\AA}$, $\alpha=98.71(1)$, $\beta=93.97(1)$, $\gamma=104.44(1)^\circ$, $V=835.6(3)\text{\AA}^3$ dan $Z=2$. Molekul sebatian ini mempunyai tiga ikatan hidrogen intramolekul dan dalam struktur hablur terdapat dua ikatan hidrogen intermolekul, C-H...O dan N-H...O yang mencantumkan molekul menjadi susunan rantaian satu-dimensi [1]. Tindak balas dengan analin pula menghasilkan sebatian heterosiklik, 3-dimetil-5-metil-6-fenil-2,5-dihidropirimidin-2-tion [2]. Struktur siklik dan kehilangan kumpulan karbonil tidak membenarkan pembentukan ikatan intrahidrogen. Namun demikian dalam struktur hablur, ikatan hidrogen intermolekul mencantumkan dua molekul membentuk dimer dan tersusun selari dengan permukaan bc. Mekanisme tindak balas sudah pasti berbeza kerana melibatkan pengisiklikan akan juga dibincangkan

Paper is not available

Kajian Pemandapan Zarah Di Sekitar Kawasan Perindustrian Kecil Balakong, Selangor, Malaysia

Norela Sulaiman¹, Mohd Rozali Othman², Maimon Abdullah¹, Salmijah Surif¹ dan Wong Pick Foon¹

1Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi Selangor

2Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi Selangor
e-mail: vozela@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Kajian ini dijalankan bagi mengetahui komposisi zarah termendap yang terdapat dalam air hujan yang dikutip dari sekitar kawasan perindustrian kecil Balakong, Selangor, Malaysia. Sebanyak lima stesen persampelan telah dipilih di sekitar kawasan perindustrian ini. Persampelan zarah termendap dilakukan berdasarkan kaedah piawai yang telah disarankan oleh Jabatan Alam Sekitar, Malaysia. Kajian zarah termendap melibatkan kepekatan pepejal terlarut dan pepejal tidak terlarut, anion (nitrat, sulfat, klorida,), kation (kalium, magnesium, natrium, kalsium dan ammonium) dan juga unsur-unsur surih seperti plumbum, kadmium, ferum, kalsium, kalium, kromium, magnesium, kobalt dan mangan. Selain itu, kepekatan abu dan nilai pH juga disukat. Purata kepekatan jumlah zarah termendap didapati tinggi ($380.45 \pm 44.44 \text{ mgm}^{-2}\text{hari}^{-1}$) dan telah melebihi nilai yang disarankan oleh Jabatan Alam Sekitar Malaysia ($133 \text{ mgm}^{-2}\text{hari}^{-1}$). Bagi logam-logam surih, purata kepekataannya dalam air hujan sepanjang tempoh persampelan adalah 0.04 ± 0.01 (kadmium), 0.49 ± 0.02 (mangan), 1.33 ± 0.08 (kobalt), 2.83 ± 0.09 (plumblum) dan 0.56 ± 0.03 (ferum). Nilai purata kepekatan logam-logam surih dalam abu ialah 1.87 ± 0.31 (kalium), 0.50 ± 0.04 (magnesium), 0.81 ± 0.10 (kalsium), 0.02 ± 0.01 (kadmium), 0.30 ± 0.05 (mangan), 0.50 ± 0.10 (kobalt), 1.79 ± 0.17 (plumblum) dan 3.18 ± 0.68 (ferum). Selain itu, hujan berasid didapati berlaku di kawasan perindustrian kecil Balakong ini kerana nilai purata pH (3.78 ± 0.63) sepanjang tempoh persampelan di kawasan ini adalah lebih rendah daripada pH air hujan yang normal (5.6).

Paper is not available



Kesan Penambahan Karbon Hitam ke Atas Sifat Mekanik dan Morfologi Adunan Getah Asli / Polistirena

Norlinda Daud¹⁾, Ibrahim Abdullah²⁾

1) Jabatan Kimia, Universiti Pendidikan Sultan Idris
Tanjung Malim, Perak, 35900, Malaysia
e-mail: norlinda@upsi.edu.my

2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Universiti Kebangsaan Malaysia
Bangi, Selangor, 43600, Malaysia
e-mail: dia@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Kesan penambahan pengisi karbon hitam (CB) ke atas sifat mekanik dan morfologi adunan getah asli polistirena (NR/PS) telah dikaji. Adunan NR/PS/CB disediakan dengan kaedah adunan leburan menggunakan mesin pengadun dalaman. Dua komposisi adunan telah disediakan iaitu 60/40 dan 40/60 menggunakan 0.5 phr dikumul peroksida (DCP) sebagai agen taut silang dan 5% LNR sebagai pengserasi. Sifat adunan dinilai melalui ujian regangan, hentaman, kekerasan, pembengkakan, peratus getah terjerap, kajian morfologi dan analisis terma mekanik dinamik. Kajian mendapati, bagi kedua-dua komposisi NR/PS, kekuatan regangan, modulus Young dan kekerasan adunan meningkat dengan pertambahan kandungan pengisi karbon hitam (CB). Peningkatan sifat mekanik ini menunjukkan wujud interaksi yang kuat di antara matriks dan pengisi. Terikan putus dan kekuatan hentaman bagi adunan NR/PS 60/40 berkurang dengan penambahan CB tetapi meningkat bagi adunan 40/60. Adunan NR/PS adalah tidak serasi terutama bagi adunan yang kaya dengan plastik. Penambahan CB ke dalam adunan dapat meningkatkan keserasian adunan dan seterusnya memperbaiki sifat-sifat mekanik dan morfologi adunan. Morfologi yang lebih halus dan seragam dapat diperhatikan bagi kedua-dua komposisi adunan apabila CB ditambah. Kandungan getah terjerap meningkat bagi kedua-dua komposisi adunan manakala indeks pembengkakan pula berkurang. Analisis terma mekanik dinamik memberikan dua puncak redaman ($\tan \delta$) pada julat -47°C - -39°C mewakili suhu peralihan kaca (T_g) fasa NR, dan 112°C - 118°C mewakili T_g fasa PS.

Paper is not available

Terbitan Ferosena Sebagai Mediator Dalam Sistem Biosensor

Noorshida Mohd Ali¹, Bohari M. Yamin² dan Lee Yoke Heng²

¹Jabatan Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Pendidikan Sultan Idris,
35900 Tanjung Malim, Perak, Malaysia

e-mail: noorshida@upsi.edu.my

²Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi,

Universiti Kebangsaan Malaysia,

43600 Bangi, Selangor, Malaysia

e-mail: bohari@pkrisc.cc.ukm.my, lyk@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

[4](1)(1,4-dimetil-2,3-diazabuta-1,3-diena)ferosenofan (2) mempunyai sistem hablur monoklinik dengan kumpulan ruang $P2_1/c$, $a=10.4863(10) \text{ \AA}$, $b=7.7514(8) \text{ \AA}$, $c=12.8153(13) \text{ \AA}$ dan $\beta=108.409(2)^\circ$. Analog yang lebih mudah [4](1)(2,3-diazabuta-1,3-diena)ferosenofan (3) juga mempunyai sistem monoklinik dengan kumpulan ruang $P2_1/c$, $a=7.5844(11) \text{ \AA}$, $b=10.0804(14) \text{ \AA}$, $c=12.1698(16) \text{ \AA}$ dan $\beta=105.727(3)^\circ$. Kedua-dua sebatian ferosenofan tersebut bersifat diskret dan sentrosimetri pada pertengahan ikatan N-N. Gelang siklopentadienil bagi kedua-dua kumpulan ferosena di dalam molekul tersebut berkonformasi gerhana dan terletak pada kedudukan trans antara satu sama lain. Kajian siklik voltametri (CV) kedua-dua ferosenofan dan terbitan ferosena iaitu $\text{FeC}_{12}\text{H}_{12}\text{O}$ (1), $\text{FeC}_{12}\text{H}_{11}\text{OCl}$ (4), $\text{FeC}_{17}\text{H}_{16}$ (5), $\text{FeC}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ (6) dan $\text{FeC}_{16}\text{H}_{14}$ (7) mempunyai nilai keupayaan pengoksidaan $E_{1/2}$ yang meningkat mengikut jujukan $\text{Fc} < (5) < (7) < (2) < (6) < (1) < (3) < \text{FeC}_{11}\text{H}_{10}\text{O}$ dan seterusnya menunjukkan kesan gantian penarik dan penderma elektron yang terikat pada gelang siklopentadienil(Cp) ferosena. Kesemua terbitan tersebut memberikan siklovoltamogram yang baik. Kajian terhadap sebatian (5), (6) dan (7) dalam sistem biosensor yang mengandungi enzim GOD memberikan rangsangan arus yang positif. Walau bagaimanapun, rangsangan arus tidak dikesan dalam kehadiran glukosa terhadap keupayaan yang diberikan. Sebaliknya ferosena tanpa kumpulan gantian memberikan rangsangan arus. Ketidkrangsangan ini perlu dikaji dengan mendalam dari segi kemungkinan interaksi sampingan dengan kehadiran enzim dan glukosa atau ketidaksesuaian monomer HEMA bagi sistem matriks terbitan ferosena semasa pembentukan filem. Masalah ini merupakan satu peluang kajian lanjutan yang lebih mendalam.

Kata kunci : ferosenofan, biosensor

1. Pendahuluan

Ferosena yang mudah mengalami redoks merupakan calon penting sebagai rujukan dalam proses yang melibatkan perpindahan elektron khususnya dalam bidang elektrokimia. Pelbagai pendekatan dalam proses fabrikasi dan juga modifikasi dilakukan untuk keperluan sesuatu aplikasi. Sistem matriks ferosena kepada sesuatu polimer telah mendapat perhatian sebagai satu kaedah pembinaan elektrod biosensor bagi penentuan glukosa

seperti poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) (Watanabe et al. 1987) dan sebagai penerima elektron bagi menggantikan oksigen dalam pembinaan elektrod biosensor (Bu et al. 1995).

Ferosenofan merupakan suatu sistem gelang di mana dua kumpulan siklopentadienil (Cp) ferosena dihubungkan oleh suatu atom atau jambatan molekul. Oleh itu, modifikasi ferosena kepada ferosenofan yang mempunyai

jambatan molekul terdiri daripada kumpulan konjugat azometina, $C=N-N=C$ diharap dapat mempertingkatkan konduktiviti perpindahan elektron dalam proses redoks. Sifat ini akan menjadikan terbitan ferosena sebagai suatu dawai molekul (Heo et al. 1999) yang membenarkan pengaliran elektron berlaku antara dua unit ferosena dan seterusnya menyumbang kepada penghasilan arus elektrik.

2. Percobaan

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah reagen gred Analar dan digunakan terus tanpa penulenan. Ferosena, kloroasetil klorida, metanol, Al_2O_3 neutral, asid fosforik, etil asetat dan natrium hidroksida diperolehi daripada MERCK-Schuchardt. Aluminium klorida kontang, hidrazina, natrium nitrit, natrium sulfat kontang, 3-nitroanilin, enzim *glucose oxidase* (GOD), glukosa monohidrat, larutan penimbal fosfat dan tetrabutylammonium heksafluorofosfat (NBu_4PF_6) daripada Fluka-Chemika. n-heksana dan tetrahidrofuran (THF) pula daripada J.T. BAKER. Bahan kimia yang lain adalah kloroform (Fisher Chemical), diklorometana (LAB.SCAN), magnesium sulfat (R&M Chemicals), asid asetik glasial dan asetonitril (BDH Chemicals Ltd.), asetik anhidrida dan anilina (Riedel-de-Haën), asid sulfurik dan *p*-toluidina, 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPP)(Aldrich) dan monomer 2- hidroksietil metakrilat (Sigma). Larutan penimbal fosfat disediakan menggunakan air suling dan larutan glukosa pula disediakan dengan melarutkannya di dalam 0.1 M penimbal fosfat (pH 7).

Penyediaan asetilferosena

Sebatian ferosena (50 g, 270 mmol) dilarutkan dalam asetik anhidrida (170 ml). Mangkin asid fosforik (15 ml) dimasukkan setitik demi setitik ke dalam larutan ferosena yang dikacau dengan pengacau magnet dan seterusnya dipanaskan sehingga $100^\circ C$. Beberapa ketul ais dimasukkan ke dalam campuran larutan dan 20% NaOH dimasukkan setitik demi setitik hingga pH 7 dan mendak jingga terbentuk. Mendakan yang diperolehi dicuci dengan air suling dan dibiarkan kering. Seterusnya produk dihablurkan semula dalam n-heksana dan selepas beberapa hari hablur berbentuk jarum berwarna jingga kemerahan terhasil (1).

Penyediaan ferosenofan

Sebatian asetilferosena (0.50 g, 2.2 mmol) ditambahkan ke dalam metanol (10 ml) dan dikacau sehingga larut. Sebatian hidrazina (0.11 g, 2.2 mmol) dan asid asetik glasial (0.5 ml) ditambahkan ke dalam campuran larutan tersebut. Campuran larutan dikacau selama satu jam pada suhu bilik. Selesai dikacau, campuran larutan dituras dan dibiarkan meruap pada suhu bilik. Mendakan yang diperolehi, dicuci dengan metanol sejuk dan kemudian dibiarkan kering. Hablur berbentuk kepingan berwarna merah gelap diperolehi daripada penghabluran semula dalam larutan campuran diklorometana dan n-heksana (2) dan (3).

Penyediaan kloroasetilferosena

Sebatian ferosena (12.00 g, 60 mmol) dilarutkan dengan diklorometana (100 ml) di dalam kelalang bulat. Sebatian kloroasetil klorida (13.55 g, 120 mmol) dimasukkan setitik demi setitik ke dalam campuran larutan yang dikacau dengan pengacau magnet. Kemudian kelalang bulat tersebut direndam di dalam bekas berais sehingga keseluruhan campuran larutan menjadi sejuk. Seterusnya, aluminium klorida kontang (8.00 g, 60 mmol) dimasukkan ke dalam campuran larutan yang telah sejuk dan dikacau perlahan-lahan pada suhu bawah $5^\circ C$ selama dua jam. Campuran larutan kelihatan berwarna biru kehitaman menunjukkan tindak balas telah berlaku. Pengacauan diteruskan semalaman pada suhu bilik.

Campuran larutan dituang perlahan-lahan ke dalam air suling (100 ml) yang mengandungi beberapa ketul ais dan dikacau dengan kuat selama 30 minit. Selepas dikacau larutan tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah. Dua lapisan, akueus berwarna biru dan bukan akueus berwarna jingga perang terbentuk. Larutan akueus diekstrak dengan diklorometana (2 x 50 ml). Larutan ekstraksi tersebut kemudian dicuci dengan air suling (50 ml) dan 20% natrium hidroksida (2 x 50 ml) serta dikeringkan dengan memasukkan magnesium sulfat kontang. Produk dipisahkan secara kromatografi turus dengan menggunakan turus pepejal alumina dan eluen yang terdiri daripada campuran larutan petroleum eter dan kloroform. Produk dihablurkan semula dalam diklorometana dan n-heksana untuk memberikan hablur berbentuk kepingan berwarna jingga (4).

Penyediaan arilferosena

Sebatian ferosena (1.86 g, 10 mmol) dilarutkan dengan tetrahidrofur, THF (50 ml) dan disimpan di dalam takungan ais kering. Sebatian amina (10 mmol) dimasukkan ke dalam kelalang kon yang mengandungi 20% H₂SO₄ (50 ml). Kelalang tersebut juga disimpan di dalam takungan yang mengandungi ais kering. Seterusnya, NaNO₂ (0.69 g, 10 mmol) dalam 20% H₂SO₄ (15 ml) dimasukkan ke dalam campuran larutan amina tersebut secara perlahan-lahan dan dikacau dengan pengacau magnet selama 30 minit. Suhu dikekalkan bawah 0°C. Kemudian, larutan ferosena dimasukkan ke dalam larutan garam diazonium tersebut dan pengacauan diteruskan semalaman pada suhu bawah 0°C.

Selepas satu hari, keladak berwarna biru kehitaman terbentuk dan dicurahkan ke dalam bikar yang mengandungi air suling (150 ml) bercampur beberapa ketul ais. Larutan natrium ditionat, NaS₂O₆ (1.26 g, 10 mmol) dimasukkan setitik demi setitik ke dalam campuran larutan tersebut sehingga warna biru kehitaman keladak hilang bertujuan untuk menurunkan ion ferosenium. Semua larutan tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah dan produk diekstrak dengan etil asetat (3 x 80 ml). Larutan ekstraksi tersebut dilakukan penyejatan menggunakan penyejat berputar sehingga pepejal perang diperolehi.

Pepejal perang tersebut kemudiannya dilarutkan dalam etil asetat dan seterusnya dilakukan penyulingan stim untuk memisahkan ferosena yang tidak bertindak balas. Di akhir penyulingan, cecair beminyak berwarna merah kelihatan dalam kelalang dan seterusnya menjadi pepejal apabila sejuk. Kemudian pepejal tersebut dipisahkan dan dilarutkan dalam etil asetat semula dan dikeringkan dengan memasukkan magnesium sulfat kontang. Pemisahan secara kromatografi turus dilakukan ke atas produk dengan menggunakan turus pepejal alumina dan eluen terdiri daripada campuran larutan etil asetat dan diklorometana untuk menghasilkan produk (5), (6) dan (7).

Penyediaan elektrod

Sebatian terbitan ferosena ditambahkan ke dalam campuran monomer HEMA and DMPP. Larutan fotopolimer terpegun terbitan ferosena (Fc/HEMA) dipipetkan ke atas elektrod skrin-

bercetak (SPE). Seterusnya elektrod tersebut didedahkan kepada cahaya ultralembayung selama 10 minit.

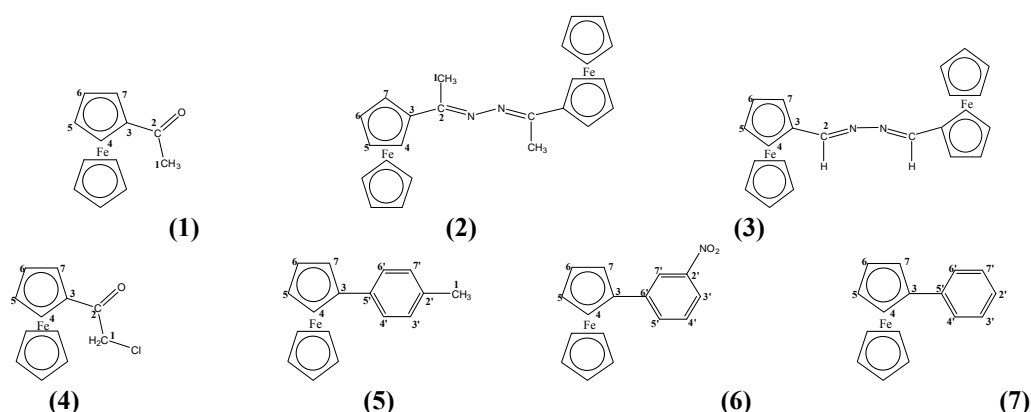
Instrumentasi

Pengukuran takat lebur ke atas produk dilakukan oleh alat "Digital Melting Point" model Elektroterma 1A 9100 (0-400°C). Analisis mikroanalisis unsur (C,H,N,S dan O) dilakukan oleh penganalisis model Thermo Finnigan Flash EA 1112. Seterusnya spektrometer inframerah (IR) model Perkin Elmer Spectrum GX yang mempunyai julat imbasan dari 4000 - 400 cm⁻¹ bersama pelet KBr digunakan untuk penentuan kumpulan berfungsi bagi produk. Analisis RMN ¹H dan ¹³C pula dilakukan oleh alat JNM-ECP 400 bersama pelarut CDCl₃ dan bahan rujukan Si(CH₃)₄. Hablur tunggal yang baik dianalisis menggunakan alat Diffraktometer Bruker Smart Apex dengan program SHELXTL. Analisis siklik voltamogram (CV) dilakukan oleh alat Autolab PGSTST12 Potentiostat/Galvanostat dan menggunakan Ag/AgCl sebagai elektrod rujukan, Glassy Carbon sebagai elektrod tambahan serta Platinum sebagai elektrod kerja untuk pengiraan. Untuk kajian biosensor, elektrod kerja digantikan dengan elektrod skrin-bercetak Fc/HEMA.

3. Hasil dan Perbincangan

Tujuh sebatian terbitan ferosena telah berjaya disintesis iaitu FeC₁₂H₁₂O (1), Fe₂C₂₄H₂₄N₂ (2), Fe₂C₂₂H₂₀N₂ (3), FeC₁₂H₁₁OCl (4), FeC₁₇H₁₆ (5), FeC₁₆H₁₃O₂N (6) dan FeC₁₆H₁₄ (7) (Rajah 1). Ciri-ciri fizikal dan data mikroanalisis unsur didapati bersetuju dengan formula molekul semua sebatian yang dicadangkan dan disenaraikan dalam Jadual 1.

Spektrum inframerah(IR) terbitan ferosena ditunjukkan dalam Jadual 2. Ciri kumpulan ferosena iaitu regangan $\nu(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{CH})$, $\delta(\text{CH})_{\text{Cp}}$ dan gelang-logam masing-masing pada panjang gelombang 3089, 2343, 1104, 1005, 823 and 500 cm⁻¹. Kehadiran regangan $\nu(\text{C}=\text{N})$ pada 1628 cm⁻¹ bagi sebatian (3) dan didapati nilai ini agak tinggi bagi $\nu(\text{C}=\text{N})$ yang lazim setelah dibandingkan dengan sebatian ferosenofan sebelum ini iaitu [4](1)(1,4-dimetil-2,3-diazabuta-1,3-diena)ferosenofan (2) [1598.50cm⁻¹]. Terdapat regangan kumpulan karbonil $\nu(\text{C}=\text{O})$ s (1) and (4) masing-masing pada panjang gelombang 1654 and 1678 cm⁻¹.



RAJAH 1. Terbitan ferosena

JADUAL 1 Mikroanalisis unsur dan ciri-ciri fizikal terbitan ferosena (1) hingga (7)

Sebatian	Formula Molekul	Warna Sebatian	Peratusan Hasil (%)	Takat Lebur (°C)	Mikroanalisis Unsur: Eksperimen (Kiraan) (%)		
					C	H	N
(1)	FeC ₁₂ H ₁₂ O	Jingga	47.0	82-84	64.22 (63.20)	5.20 (5.30)	-
(2)	Fe ₂ C ₂₄ H ₂₄ N ₂	Jingga gelap	42.0	216-217	63.82 (63.75)	5.93 (5.35)	6.05 (6.20)
(3)	Fe ₂ C ₂₂ H ₂₀ N ₂	Jingga gelap	40.0	213-216	61.60 (62.31)	4.60 (4.75)	6.22 (6.61)
(4)	FeC ₁₂ H ₁₁ OCl	Jingga	32.2	91-93	55.53 (55.20)	4.06 (4.13)	-
(5)	FeC ₁₇ H ₁₆	Jingga	37.0	-	72.21 (73.94)	5.40 (5.84)	-
(6)	FeC ₁₆ H ₁₃ O ₂ N	Jingga gelap	42.0	-	61.89 (62.57)	4.19 (4.27)	4.43 (4.56)
(7)	FeC ₁₆ H ₁₄	Jingga	51.0	-	72.89 (73.31)	5.20 (5.38)	-

JADUAL 2 Serapan inframerah (IR) terbitan ferosena (1) hingga (7)

Sebatian	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\delta_s(\text{CH}_2\text{-Cl})$	$\delta_s(\text{CH}_3)$
Ferosena	-	-	-	-
(1)	-	-	-	1373m 1456m
(2)	1598s	895m	-	1359m
(3)	1628s	-	-	-
(4)	-	-	1452m 1239m	-
(5)	-	1525m 1451m 1451m	-	-
(6)	-	1600m 1496m	-	-
(7)	-	1597m 1450m	-	-

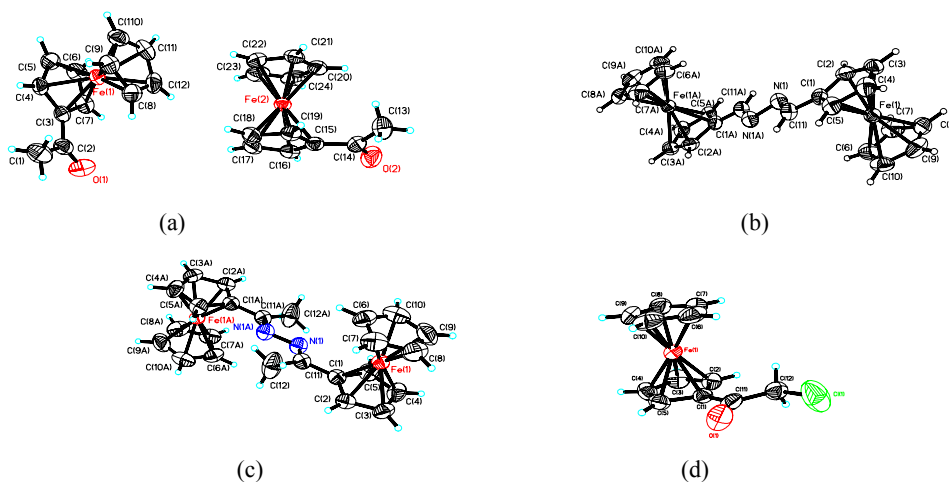
s=tajam, m=medium

Kehadiran kumpulan nitro (6) dibuktikan dengan puncak tajam pada panjang gelombang 1342 and 1524 cm^{-1} masing-masing mempunyai regangan simetri dan asimetri kumpulan N-O.

Spektrum resonan magnetik nukleus (RMN) ¹H (1) hingga (7) (Jadual 3) menunjukkan kehadiran isyarat seperti triplet asimetri pada anjakan kimia, δ 4.30-4.90 ppm untuk H_α dan H_β. Walau bagaimanapun, puncak ini

JADUAL 3 Anjakan kimia ^1H dan ^{13}C terbitan ferosena (**1**) hingga (**7**) dalam CDCl_3

Sebatian/ nukleus		Kedudukan struktur atau kumpulan											
		1	2	3	4,7	5,6	2'	3'	4'	5'	6'	7'	Cp
1	H	2.40s	-	-	4.78dd	4.51dd	-	-	-	-	-	-	4.21s
	C	27.43	202.30	79.11	67.77	72.23	-	-	-	-	-	-	69.74
2	H	2.39s	-	-	4.77dd	4.50dd	-	-	-	-	-	-	4.18s
	C	29.68	161.64	73.17	69.52	71.17	-	-	-	-	-	-	69.64
3	H	-	8.49s	-	4.71dd	4.46dd	-	-	-	-	-	-	4.25s
	C	-	161.27	77.99	68.64	70.93	-	-	-	-	-	-	69.34
4	H	4.43s	-	-	4.85dd	4.61dd	-	-	-	-	-	-	4.26s
	C	46.01	195.31	75.92	69.55	73.05	-	-	-	-	-	-	70.17
5	H	2.34s	-	-	4.62dd	4.29dd	-	7.12d	7.38d	-	7.38d	7.12d	4.05s
	C	21.14	-	85.79	66.34	68.63	135.50	129.00	126.10	136.00	126.10	129.00	69.52
6	H	-	-	-	4.73dd	4.43dd	-	8.03d	7.45t	7.78d	-	8.29s	4.07s
	C	-	-	82.46	66.79	69.87	149.03	120.49	129.22	131.66	142.13	120.38	69.81
7	H	-	-	-	4.64dd	4.31dd	-	-	-	-	-	-	4.04s
	C	-	-	85.46	66.50	68.86	125.90	128.29	126.13	139.21	126.13	128.29	69.57



RAJAH 2 Gambarajah ortep menunjukkan struktur molekul asetilferosena (a), [4](1)(1,4-dimetil-2,3-diazabuta-1,3-diena)ferosenofan (b), [4](1)(2,3-diazabuta-1,3-diena)ferosenofan (c) dan kloroasetilferosena (d) pada 50% kebarangkalian

sebenarnya mengalami pecahan spin dublet kepada dublet oleh proton yang bersebelahan dengannya. Kehadiran kumpulan penarik elektron seperti COCH_3 (**1**) and COCH_2Cl (**4**) yang mengakibatkan kesan elektronik seterusnya menyebabkan H_α ternyata perisai dan teranjak ke medan magnet yang lebih rendah dengan nilai anjakan kimia yang lebih tinggi berbanding H_β . Manakala spektrum (RMN) ^{13}C (**1**) hingga (**7**) (Jadual 3) pula menunjukkan kehadiran isyarat $\text{C}=\text{N}$ pada anjakan kimia, δ 161 ppm, isyarat $\text{C}=\text{O}$ antara δ 195-202 ppm serta moiety ferosena antara δ 67.77- δ 73.05 ppm.

Kajian kristalografi sinar-X untuk hablur (**1**) hingga (**4**) seperti Rajah 2. Struktur molekul kedua-dua sebatian ferosenofan menunjukkan molekul bersifat sentrosimetri pada pertengahan ikatan N-N. Kedua-dua kumpulan

ferosena dihubungkan oleh kumpulan azometina yang planar. Kedua-dua kumpulan ferosena ini juga berkonformasi gerhana dan terletak pada kedudukan *trans* antara satu sama lain.

Kajian elektrokimia untuk terbitan (**1**) hingga (**7**) dijalankan untuk membandingkan kesan kumpulan pengganti ke atas sifat redok atom Fe(II) ferosena yang terdiri daripada kumpulan penarik dan penderma elektron oleh kumpulan nitro, metil, karbonil dan azometina. Siklovoltamogram menunjukkan terdapat satu puncak pengoksidaan dan satu puncak penurunan berbalik. Nilai keupayaan redok $E_{1/2}$ untuk terbitan (**1**) hingga (**7**) didapati lebih tinggi daripada ferosena tanpa gantian (Jadual 4).

Kajian biosensor terhadap sebatian (**5**), (**6**) dan (**7**) dalam sistem biosensor yang mengandungi

JADUAL 4 Data elektrokimia terbitan ferosena (1) hingga (7) (V melawan Ag/AgCl)

Sebatian	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}^a$ (V)	ΔE_p^b (mV)	i_{pa} ($\times 10^{-7}$ A)	i_{pc} ($\times 10^{-7}$ A)	i_{pa}/i_{pc}^c
(5)	0.38	0.30	0.34	80	7.00	10.00	0.7
(6)	0.51	0.38	0.45	130	4.00	3.00	1.3
(7)	0.39	0.30	0.35	90	6.25	6.10	1.0

JADUAL 5 Data elektrokimia elektrod fotopolimer terpegun terbitan ferosena Fc/HEMA (5) hingga (7) (V melawan Ag/AgCl)

Sebatian	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E_{1/2}^a$ (V)	ΔE_p^b (mV)	i_{pa} ($\times 10^{-5}$ A)	i_{pc} ($\times 10^{-5}$ A)	i_{pa}/i_{pc}^c
Ferosena	0.43	0.34	0.39	90	2.00	2.00	1.0
FeC ₁₁ H ₁₀ O	0.76	0.66	0.71	100	4.50	3.84	1.2
(1)	0.72	0.62	0.67	100	2.25	1.96	1.1
(2)	0.60	0.44	0.52	160	4.50	3.50	1.3
(3)	0.77	0.63	0.70	140	3.50	2.50	1.2
(5)	0.47	0.39	0.43	80	5.62	4.23	1.3
(6)	0.60	0.47	0.54	130	4.55	3.45	1.3
(7)	0.51	0.37	0.44	140	4.95	3.50	1.4

enzim GOD memberikan rangsangan arus yang positif serta mempunyai siklovoltamogram yang baik (Jadual 5). Walau bagaimanapun, rangsangan arus tidak dikesan dalam kehadiran glukosa terhadap keupayaan yang diberikan. Sebaliknya ferosena tanpa kumpulan gantian memberikan rangsangan arus. Ketidakrangsangan ini perlu dikaji dengan mendalam daripada segi kemungkinan interaksi sampingan dalam kehadiran enzim dan glukosa atau ketidaksesuaian monomer HEMA bagi sistem matriks terbitan ferosena semasa pembentukan filem.

4. Kesimpulan

Tujuh sebatian terbitan ferosena iaitu FeC₁₂H₁₂O (1), Fe₂C₂₄H₂₄N₂ (2), Fe₂C₂₂H₂₀N₂ (3), FeC₁₂H₁₁OCl (4), FeC₁₇H₁₆ (5), FeC₁₆H₁₃O₂N (6) dan FeC₁₆H₁₄ (7) telah berjaya disintesis. Struktur semua sebatian tersebut disokong oleh data mikroanalisis unsur dan spektroskopi inframerah dan resonan magnet nukleus. Empat daripada terbitan ferosena tersebut telah diperolehi sebagai hablur iaitu sebatian (1), (2), (3) dan (4). Melalui kajian siklik voltametri, siklik voltamogram (CV) yang baik telah diperolehi bagi semua terbitan ferosena dalam

larutan asetonitril dan jujukan nilai $E_{1/2}$ adalah seperti berikut : Fc < (5) < (7) < (2) < (6) < (1) < (3) < FeC₁₁H₁₀O. Walau bagaimanapun, dalam kajian biosensor, ferosenofan (2) dan (3) yang mempunyai jambatan molekul terdiri daripada kumpulan konjugat azometina, C=N-N=C yang diharap dapat mempertingkatkan konduktiviti perpindahan elektron dalam proses redoks tidak dapat menunjukkan hasil yang memuaskan.

5. Ucapan Terimakasih

Penyelidikan ini dijalankan di bawah peruntukan IRPA 09-02-02-0163 Universiti Kebangsaan Malaysia dan biasiswa National Science Fellowship (NSF) Kementerian Sains dan Inovasi (MOSTI), Malaysia.

6. Daftar Pustaka

- Watanabe, J., Hisatome, M. & Yamakawa, K. 1987. Synthesis of [4][3₄](1,2,3,4,5) ferrocenophane. *Tetrahedron Lett.* **28** (13) : 1427-1430.
- Bu, H-Z., Mikkelsen, S.R. & English, A.M. 1995. Characterization of a ferrocene-containing polyacrylamide-based redox gel for biosensor use. *Anal. Chem.* **67** : 4071-4076.
- Heo, R.W. & Lee, T.R. 1999. Review : ferrocenophane with all carbon bridges. *J. Organomet. Chem.* **578** : 31-42.

O-metiloktandrenolona dari *Acronychia pedunculata*

Noor Hapeedah M. A¹⁾, Jalifah L.²⁾, Yana M. Syah.³⁾, Euis H. Hakim.⁴⁾

¹⁾ Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

peedah@lycos.com

²⁾ Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

jali@pkrisc.cc.ukm

³⁾ Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

yana@chem.itb.ac.id

⁴⁾ Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

euis@mail.chem.itb.ac.id

Abstrak

Kajian kimia ke atas bahagian batang *Acronychia pedunculata* telah dijalankan. Pelbagai kaedah pemisahan telah dilakukan ke atas ekstrak metanol batang dan berjaya mengasingkan satu sebatian dipiranoasetofenon iaitu *o*-metiloktandrenolona. Struktur *o*-metiloktandrenolona di cirikan berdasarkan data analisis spektrum Resonans Magnet Nukleus (RMN). Berdasarkan data literatur, *o*-metiloktandrenolona merupakan sebatian yang pertama kali diasingkan daripada *Acronychia pedunculata*.

Kata kunci: *o*-metiloktandrenolona, dipiranoasetofenon, *Acronychia pedunculata*, Rutaceae

1. Pendahuluan

Acronychia pedunculata dikelaskan sebagai pohon yang rendah dengan ketinggian 30 meter dengan batang berdiameter 50 sentimeter. Tumbuhan ini boleh dijumpai di kawasan tanah rendah iaitu pada ketinggian 1500 meter daripada aras laut dan tumbuh secara meluas di Semenanjung Malaysia [Ridley 1967]. *A. pedunculata* telah digunakan secara tradisional bagi merawat penyakit kulit, sakit perut serta sebagai ubat penahan sakit [Burkill 1996]. Kajian terdahulu ke atas hampir keseluruhan bahagian tumbuhan ini telah melaporkan pengasingan sebatian alkaloid [De Silva et al 1979; Kumar et al. 1989; Cui et al. 1999], kumarin [Rahmani et al. 1996], kromena [Kumar et al. 1989], triterpena [Kumar et al. 1989; Rahmani et al. 1996; Lahey dan Leeding 1958], terbitan asetofenon [De Silva et al 1991; Kumar et al. 1989; Biswas et al. 1973; Banerjee dan Chattajee 1973; Sy et al. 1999] dan lignan

[Cui et al. 1999]. Kajian lanjutan yang dijalankan ke atas ekstrak metanol bahagian batang *A. pedunculata*, telah berjaya mengasingkan satu sebatian dipiranoasetofenon yang dikenali sebagai *o*-metiloktandrenolona. Dalam laporan ini, eksperimen RMN 2D telah digunakan bagi menentukan struktur sebatian *o*-metiloktandrenolona.

2. Kaedah Eksperimen

Data analisis RMN satu dan dua dimensi diperolehi dengan peralatan spektrometer JEOL ECP-400 MHz dalam pelarut CDCl₃. Anjakan kimia, δ dalam ppm manakala pemalar gandingan dalam nilai Hz. Spektrum UL direkodkan menggunakan spektrofotometer Varian Cary 100, manakala spektrum IM diperolehi dengan peralatan spektrofotometer Spectrum One Perkin Elmer. Spektrometer jisim yang digunakan adalah daripada model GCHP 6890 dan MS 5972.

Pengekstrakkan dan pemisahan

Batang *Acronychia pedunculata* telah diperolehi daripada kawasan Hutan Simpan, Taman Negeri Endau-Rompin, Pahang dan spesimen baucer (SK217/02) disimpan di herbarium UPM, Malaysia. Setelah kering, serbuk batang diekstrak dengan peralatan soxlet dalam pelarut petroleum eter, etil asetat dan metanol. Seterusnya ekstrak mentah metanol (2.96g) dipisahkan dengan kromatografi cecair vakum (KCV) dengan pelarut *n*-heksana sebagai pengelusi yang ditingkatkan kekutubannya dengan penambahan pelarut etil asetat dan diakhiri dengan metanol bagi memperoleh 6 fraksi gabungan (KG1-KG6). Penulenan awal fraksi KG4 (0.218 g) dilakukan dengan kaedah pemendapan sejuk dan larutan yang diperolehi dituras. Hasil turasan yang dipekatkan seterusnya dituliskan dengan kromatotron menggunakan campuran pelarut *n*-heksana:etil asetat sebagai pengelusi bagi memperoleh sebatian *o*-metiloktandrenolona (0.007 g).

O-metiloktandrenolona, Pepejal amarfus kuning. UL (MeOH) λ_{mak} : 212, 263, 264, 318 nm, IM v_{maks} : 2934, 2833, 1635, 1637, 1506 cm^{-1} . MS: $m/z = 314 [M]^+$, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$, 299, 281, 269, 251. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 5.53 (d, $J = 9.9$, H-3 $''$), 6.61 (d, $J = 9.9$, H-4 $''$), 5.55 (d, $J = 9.9$, H-3 $'''$), 6.51 (d, $J = 9.9$, H-4 $'''$) 3.75 (s, OMe-6), 2.51 (s, COCH_3 -2 $'$), 1.44 (CH_3 -5 $''/6''$), 1.43 (CH_3 -5 $'''/6'''$). RMN ^{13}C (CDCl_3) : 117.8 (C-1), 151.6 (C2), 106.7 (C3), 150.7 (C4), 108.4 (C5), 153.9 (C6), 63.8 (OMe-6), 201.1 (C1 $'$), 32.8 (C2 $'$), 77.30 (C2 $''$), 127.9 (C3 $''$), 116.4 (C4 $''$), 28.2 (2CH_3 -2 $''$), 77.4 (C2 $'''$), 127.9 (C3 $'''$), 116.9 (C4 $'''$), 28.1 (2CH_3 -2 $'''$).

3. Hasil dan perbincangan

Pemisahan ke atas ekstrak metanol bahagian batang *A. pedunculata* telah berjaya memencilkan sebatian *o*-metiloktandrenolona yang diperolehi sebagai pepejal amorfus berwarna kuning. Spektrum UL menunjukkan jalur serapan maksimum pada 263 dan 318 nm manakala puncak ion molekul, M^+ yang dicerap pada m/z 314 berpadanan dengan formula molekul $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$.

Spektrum RMN ^1H menunjukkan ciri-ciri bagi terbitan asetofenon yang berikatan dengan dua unit dimetilpiran yang tidak simetri [Timar et al. 1988]. Empat set dublet pada δ 5.53 (H-3 $''$)

dan δ 6.61 (H-4 $''$) serta pada δ 5.55 (H-3 $'''$) dan δ 6.51 (H-4 $'''$) dengan pemalar penggandingan masing-masing adalah 9.9 Hz merupakan isyarat bagi dua pasang proton olefinik yang terdapat dalam dua gelang piran. Isyarat singlet pada δ 3.75 merupakan isyarat bagi proton metoksi manakala satu isyarat singlet pada δ 2.51 dicirikan sebagai proton metil yang berikatan dengan atom atau kumpulan elektronegatif menyebabkannya teranjak ke medan rendah. Isyarat selebihnya merupakan dua pada δ 1.43 dan δ 1.44 yang merupakan isyarat bagi dua kumpulan dimetil geminal pada dua gelang piran yang berbeza.

Spektrum RMN ^{13}C menunjukkan isyarat yang bersesuaian dengan sebatian dipiranoasetofenon. Isyarat bagi empat karbon metina diberikan oleh puncak pada δ 127.9 (C-3 $''$), δ 116.4 (C-4 $''$), δ 127.9 (C-3 $'''$) dan δ 116.9 (C-4 $'''$) manakala puncak pada δ 63.8 merupakan isyarat bagi karbon metoksi aromatik. Sementara itu, dua puncak pada δ 32.8 (CH_3CO) dan δ 201.2 (C=O) membuktikan kehadiran kumpulan metil keton atau asetil. Dua isyarat tajam di medan tinggi pada δ 28.2 dan δ 28.1 merupakan isyarat karbon bagi kumpulan dimetil geminal (C-5 $''$, C-6 $''$, C-5 $'''$ dan C6 $'''$). Tujuh isyarat selebihnya merupakan isyarat bagi karbon kuartener iaitu pada δ 117.8 (C-1), δ 151.6 (C-2), δ 106.7 (C-3), δ 150.7 (C-4), δ 108.4 (C-5), δ 153.9 (C-6), dan δ 77.4 (C2 $''$) dan δ 77.3 (C2 $'''$).

Kedudukan kumpulan tertukarganti metoksi dan asetil serta perlakuan gelang piran kepada rangka asetofenon ditentukan melalui eksperimen 2D ^1H - ^1H NOESY (Rajah 1). Isyarat proton metoksi pada δ 3.76 menunjukkan interaksi nOedengan isyarat proton metil pada δ 2.51 dan isyarat dublet pada δ 6.51. Maka, kumpulan asetil dan kumpulan metoksi masing-masing perlu berikatan secara orto pada gelang benzina. Di samping itu, interaksi nOe juga dicerap di antara proton metil keton dengan kumpulan gem-dimetil pada δ 1.43. Ini bermakna dua gelang dimetilpiran masing-masing perla terlakur pada kedudukan orto dan meta terhadap kumpulan asetil (C-2 dan C-3) serta metoksi (C-5 dan C4). Interaksi dalam ruang lain yang dicerap ialah di antara isyarat kumpulan gem-dimetil pada δ 1.44 dan δ 1.43

dengan isyarat dublet pada δ 5.53 (H-3'') dan δ 5.55 (H-3''') yang memberikan kedudukan kumpulan gem-dimetil pada C-2'' dan C-2'''.

Kedudukan karbon kuartener serta kumpulan tertukarganti yang hadir dalam struktur seterusnya dikenalpasti dengan analisis 2D ^1H - ^{13}C HMBC (Rajah 1). Terdapat interaksi $^2J_{\text{C-H}}$ di antara isyarat proton metil pada δ 2.51 dengan isyarat karbon karbonil δ 201.2 (C-1') membuktikan kehadiran kumpulan asetil yang berikatan pada C-1. Seterusnya, interaksi $^3J_{\text{C-H}}$ juga dicerap di antara isyarat proton metina pada δ 6.51 (H-4'') dan isyarat metoksi pada δ 3.75 dengan isyarat karbon kuartener pada δ 153.8 (C-6) yang memerlukan kumpulan metoksi berikatan pada C-6 manakala satu gelang piran berikatan pada C-5 dan C-4. Sementara itu, isyarat bagi proton metina masing-masing pada δ 6.51 (H-4'') dan δ 6.61 (H-4''') menunjukkan interaksi $^3J_{\text{C-H}}$ dengan isyarat pada δ 150.7 mencirikan isyarat karbon kuartener ini sebagai C-4. Isyarat dublet pada δ 5.53 (H-3'') dan δ 5.55 (H-3''') masing-masing menunjukkan interaksi dengan isyarat karbon δ 106.7 dan δ 108.4, kedua-dua cerapan ini mencirikan isyarat karbon pada δ 106.7 dan δ 108.4 masing-masing sebagai C-3 dan C-5. Interaksi $^3J_{\text{C-H}}$ juga dicerap antara kumpulan gem-dimetil pada δ 1.44 dan δ 1.43 dengan isyarat karbon pada δ 127.9 (C-3'' dan C-3''') yang mengesahkan kedudukan gem-metil pada C-2'' dan C-2'''. Data analisis fizikal dan spektroskopi didapati berpadanan dengan data rujukan, oleh itu sebatian ini dicirikan sebagai *o*-metiloktandrenolona [Muyard et al. 1996].

4. Kesimpulan

Pemisahan ke atas ekstark metanol bahagian batang *Acronychia pedunculata* telah berjaya mengasingkan satu sebatian dipiranoasetofenon yang dikenali sebagai *o*-metiloktandrenolona. Sebatian ini pertama kali diasingkan daripada *Acronychia pedunculata*.

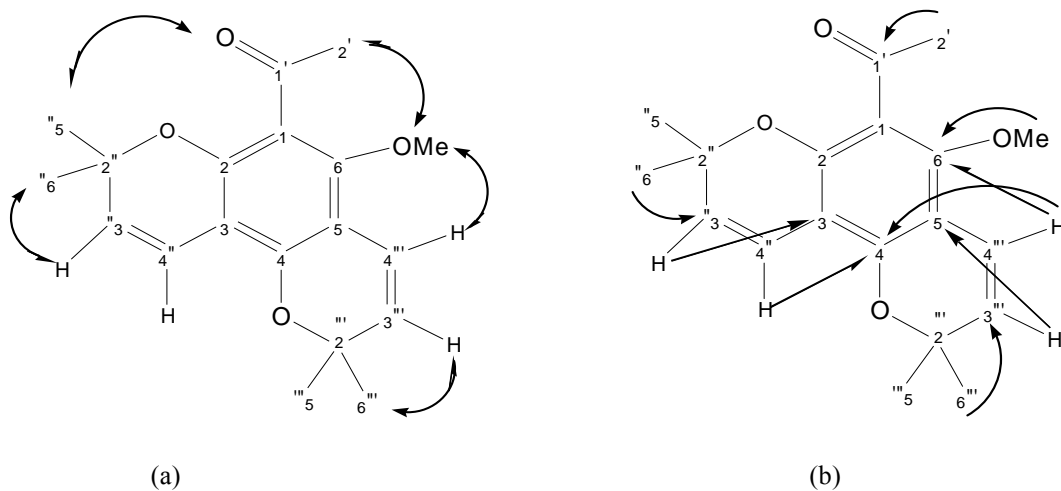
5. Terima kasih

Ucapan terima kasih kepada En. Shamsul Khamis (UPM) dan En. Isa bagi pengecaman sampel.

6. Rujukan

- Baneerji, J. R. N. dan Chattajee, A. 1973. Constituent of *A. laurifolia*. *Indian Journal of Chemistry* **11**: 693
- Biswas, G. K., Chattajee, A. 1973. Isolation and structure of acronylin: a new phenolic compound from *A. laurifolia*. *Indian Journal of Chemistry* **11**: 693
- Burkill, I. H. 1996. *A dictionary of the economic product of the Malayan Peninsula 2nd ed.* Kuala Lumpur: The Ministry of Agriculture and Cooperatives, pp1415-1416
- Cui, B., Chai, H., Dong, Y., Horgen, F. D., Hansen, B., Madulid, D. A., Soejarto, D. D., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzutto, J. M. dan Kinghorn, D. A. 1999. Quinoline alkaloids from *Acronychia laurifolia*. *Phytochemistry* **52**: 95-96
- De Silva, L. B., De Silva, U. L. L., Mahendran, M. dan Jennings, R. 1979. Kokusaginine and evolitrine from *A. pedunculata*. *Phytochemistry* **18**:1255-1256
- De Silva, L. B., Herath, W. M., Liyanage, C., Kumar, V., Ahmad, V. U. dan Sultana, A. 1991. Demethylacrovestone from *Acronychia pedunculata* fruits. *Phytochemistry* **30**(5): 1709-1710
- Kumar, V., Karunaratne, V. dan Meegalle, M. R. S. K. 1989. 1-[2',4'-dihydroxy-3',5'-di-(3''-methylbut-2''-enyl)-6'-methoxy]phenylethanone from *Acronychia pedunculata* root bark *Phytochemistry*. **28**: 127
- Lahey, F. N. dan Leeding, M. V. 1958. A new triterpene alcohol, bauerenol. *Proc. Chem. Soc.* **73**: 42
- Muyard, F., Bissque, A. N., Bevalot, F., Tillequin, F., Cabalion, P. dan Vaquette, J. 1996. Acetophenones and other constituents from the roots of *Melicope erromangensis*. *Phytochemistry* **42** (4): 1175-1179
- Rahmani, M., Taufik, Y. Y. H. dan Sukari, M. A. Constituents of *Acronychia laurifolia*. 1996. *Fitoterapia*. **67**:10
- Ridley, H. N., 1967. *The flora of the Malay Peninsular*. L.Reeve Ang & Co. Ltd
- Sy, L. K. dan Brown, G. D. 1999. 1-[2,4-dihydroxy-3'-[3''-methylbut-2''-enyl]-5'-[1'''-ethoxy-3'''-methylbutyl]-6'-metoxy]phenylethanone from *Acronychia pedunculata* *Phytochemistry*. **52**: 681
- Timar, T., Hosztafi, S. dan Jaszberenyi, J. C. 1988. Synthesis of benzopyran derivatives. IV. Synthesis of analogs of natural precocenes containing an 8-methyl substituent. *Acta chimica Hungarica* **125**: 617

LAMPIRAN



Rajah 1. Interaksi NOE (a) dan HMBC (b) yang dicerap dalam spektrum NOESY dan NBC bagi *o*-metiltandrenolona.

Chemical constituents from the roots of *Alseodaphne perakensis*

Norizan Ahmat¹ Abdul Hamid¹, Jalifah Latip², Ikram M. Said² and Laily B. Din²

¹Faculty of Applied Sciences
Universiti Teknologi MARA
40450, Shah Alam
Selangor, MALAYSIA

²Faculty of Science and Technology
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600, Bangi
Selangor, MALAYSIA

Abstract

Alseodaphne perakensis (Lauraceae) is a moderate sized tree locally known as medang tandok or medang payong. Phytochemical screening on the leaf, stem and root parts showed that this plant is rich in alkaloid. In continuing our interest on the chemistry of *A. perakensis* we now report the isolation of two alkaloids from the roots of this plant : 6, 7-dimethoxy-2-methyl-1(2H)-isoquinolone and laurilitsine. Their structures were elucidated and identified by means of the UV, IR, GC-MS, 1D and 2D NMR spectroscopic analysis.

Keywords: Lauraceae, *Alseodaphne perakensis*, alkaloid, isoquinolone, aporphine.

1. Introduction

The genus *Alseodaphne* contained about eight species in Malaysia and distributed mainly in India, southern China, eastern and southern of Malaysia (Burkill, 1966). So far, only *A. semecarpifolia* and *A. perakensis* have been studied. Literature search and on going studies have demonstrated that *A. perakensis* contained morphinandienone alkaloids (Lajis *et al.* 1989, Lajis and Mahmud 1991), phenantrene (Mahmud *et al.* 1992), protoalkaloid amides (Ahmat @ Abdul Hamid *et al.* 2005) and isoquinolone alkaloids (Norizan *et al.* 2005). Our continuous work on the alkaloid constituents of *A. perakensis* has led to the isolation and structural elucidation of 6,7-dimethoxy-2-methyl-1(2H)-isoquinolone and laurilitsine. In this paper, we now report the isolation of 6,7-dimethoxy-2-methyl-1(2H)-isoquinolone (**1**) as natural products for the first time and 2D NMR data of laurilitsine (**2**).

2. Experimental

The roots of *A. perakensis* were collected from Sungkai, Perak and a voucher specimen (ALM

5735) was deposited at UKMB herbarium of Malaysia. The roots were air-dried, ground and soaked in MeOH for 48 hours. The resulting extract was filtered and concentrated under reduced pressure to give 108.3 g of crude extract. The crude extract was acidified with 5% H₂SO₄ and filtered. The acid extract was then basified with 5% Na₂CO₃ until pH 8 – 9 was obtained prior to extraction with CHCl₃ to obtain alkaloids. The crude alkaloid (15.8 g) was chromatographed over vacuum liquid chromatography (VLC) and eluted with CHCl₃ and with increasing amounts of MeOH. The VLC of the crude alkaloid yielded four fractions, 01, 02, 03 and 04. Fraction 03 was subjected to VLC and eluted with CHCl₃ with increasing amounts of MeOH and yielded compound **1** (56 mg). Fraction 02 was further subjected to VLC and eluted with CHCl₃:MeOH in increasing polarity and yielded 87.5 mg of compound **2**.

Melting point was measured on Gallenkamp apparatus and were uncorrected. UV spectra was recorded on Shimadzu UV-160 while IR

spectra was obtained with MeOH as a solvent on a Perkin-Elmer FT-IR 1725-X. ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100.56 MHz) measurements were carried out on a JEOL ECP-400 spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm and the coupling constants are given in Hz. Gas chromatography-mass spectrometer were obtained on a Macromass LCT.

6,7-Dimethoxy-2-methyl-1(2*H*)-isoquinolone
(1)

Colorless needles. $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. Mol. wt. : 219. EIMS m/z : $[\text{M}^+]$ 219, 204, 176, 161, 146, 133, 105. ^1H NMR (δ) : 3.55 (3H, s, NCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3 -6), 3.96 (3H, OCH_3 -7), 6.36 (1H, d, $J=7.32$ Hz, H-4), 6.82 (1H, s, H-5), 6.96 (1H, d, $J=7.32$ Hz, H-3), 7.75 (1H, s, H-8). ^{13}C NMR (δ) : 37.1 (NCH_3), 56.2 (6 & 7- OCH_3), 105.6 (C-4), 106 (C-5), 107.5 (C-8), 120.1 (C-9), 131.2 (C-3), 132.6 (C-10), 149.3 (C-7), 153.3 (C-6), 161.9 (C-1)

Lauroilsitine (2)

Amorphous solid. $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$. Mol. wt. 313. UV(EtOH) λ_{max} : 221, 282, 307nm. IR(KBr) ν_{max} : 3300 (OH). EIMS m/z : $[\text{M}^+]$ 298, 298, 296, 284, 282, 255, 239. ^1H NMR (δ): 2.62 (1H, dd, $J=13.92, 13.92$ Hz, $\frac{1}{2}$ H-7), 2.69 (1H, m, $\frac{1}{2}$ H-4), 2.74 (1H, dd, $J=13.92, 4.76$ Hz, $\frac{1}{2}$ H-7), 2.99 (1H, m, $\frac{1}{2}$ H-5), 3.01 (1H, m, $\frac{1}{2}$ H-4), 3.37 (1H, m, $\frac{1}{2}$ H-5), 3.57 (3H, s, OCH_3 -1), 3.84 (3H, s, OCH_3 -10), 3.78 (1H, dd, $J=13.92, 4.76$ Hz, H-6a), 6.56 (1H, s, H-3), 6.69 (1H, s, H-8), 7.96 (1H, s, H-11) ^{13}C NMR (δ): 28.2 (C-4), 36.2 (C-7), 43.5 (C-5), 54.8 (C-6a), 56.7 (10- OCH_3), 60.5 (1- OCH_3), 113.0 (C-11), 115.6 (C-3), 116.0 (C-8), 124.7 (C-12), 125.3

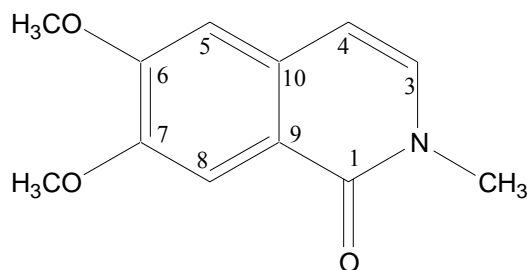
(C-13a), 127.9 (C-13), 130.0 (C-7a), 144.7 (C-1), 147.4 (C-9), 148.1 (C-10).

3. Results and discussion

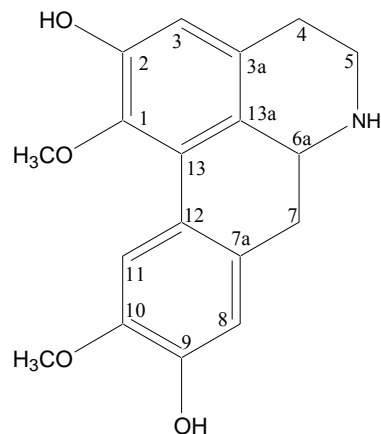
Isoquinoline and aporphine alkaloids were found to be the common constituents of Lauraceae, Ranunculaceae, Menispermaceae, Berberidaceae, Papaveraceae and Hernandiaceae (Cheng *et al.* 1994). Oxidation of benzyloisoquinoline led to the formation of isoquinolone which besides aporphine occurred as the major constituent of *A. perakensis* (Lauraceae).

6, 7-dimethoxy-2-methyl-1(2*H*)-isoquinolone (1) was isolated as colourless needle crystals. The IR spectrum showed a strong and sharp band at 1640 cm^{-1} which was characteristic of lactam functionality. The UV absorption band of 1 at 302, 259 and 225 nm were typical characteristic of the isoquinolone moiety. The mass spectrum showed a molecular ion peak at m/z 219 which corresponded to the molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. In addition, intense peaks at m/z 204, 176, 161, and 133 reflected the loss of two methyl and two carbonyl moieties from the molecule, indicated the presence of two methoxyl substituents.

The ^1H NMR spectrum of 1 exhibited two singlets at $\delta 6.82$ and 7.75 which consistent with the *para* substituted aromatic protons. In addition two *ortho* coupled aromatic protons ($J = 7.32\text{ Hz}$) were observed at $\delta 6.36$ and 6.96 . The remaining signals are three singlets at $\delta 3.93, 3.96$ and 3.55 attributable to two methoxyls and one *N*-methyl proton respectively. The ^{13}C NMR spectrum revealed 12 carbon resonances which were assignable to two methoxyls, one *N*-methyl, five



(1)



(2)

quarternary, two olefinic and two methylene carbons. Signals at δ 153.3 and 149.3 corresponded to two oxygenated aromatic quarternary carbons with methoxy groups attached as the substitution group. The most downfield signal at δ 161.9 (C=O) indicated an amide functionality, thus confirmed the isoquinolone nature.

The exact position of the two methoxyl groups was confirmed by means of ^1H - ^1H NOESY experiment. NOE interaction was observed between the methoxyl signal at δ 3.93 and the aromatic proton at δ 6.82 (H-5) (Figure 1). This aromatic proton H-5 was further interacted through space with another aromatic proton (H-4) at δ 6.36, thus placing the methoxyl (δ 3.93) at C-6 position. So, the other methoxy group at δ 3.96 has to be attached to C-7. This assignment was further supported by NOE interaction between the methoxyl (δ 3.96) and aromatic proton (H-8) at δ 7.75.

The 3J interactions observed in the HMBC spectrum of **1** were also consistent with the placement of methoxyls at δ 3.93 and δ 3.96 at C-6 and C-7 respectively, *i.e.* δ 3.93 (OCH₃-6) and δ 153.3 (C-6) and δ 3.96 (OCH₃-7) and δ 149.3 (C-7). The presence of methylated nitrogen was confirmed by the dipolar interaction between the methyl signal (δ 3.55) and the aromatic proton, H-3 (δ 6.96) and 3J interactions between the methyl (δ 3.55) with C-3 (δ 131.2) and C=O (δ 161.9) observed in the NOESY and HMBC spectrum of **1** respectively. On the basis of these spectral evidence, compound **1** was characterised as 6,7-dimethoxy-2-methyl-1(2*H*)-isoquinolone which has been previously synthesized (Kametani *et al.* 1968).

Laurolitsine (**2**) was obtained as dark brown solid amorphous. The IR spectrum of **2** exhibited a broad absorption at 3300 cm⁻¹ which indicated the presence of phenolic hydroxyl moiety. The UV absorption bands at 221, 282 and 307 nm suggested a 1, 2, 9 and 10 tetrasubstituted aporphine skeleton (Shamma 1960, Sangster & Stuart 1965). The MS gave an [M⁺] value of 313 which was consistent with the molecular formula C₁₈H₁₉NO₄. Other prominent fragmentation ions at *m/z* 298, 284, 255 and 239 reflected the loss of amine or methyl, formyl and methoxyl moieties from the molecule.

The ^1H NMR spectrum of **2** confirmed the presence of two methoxyls (OMe-1&10), two *para* substituted (H-8 & 11) and an isolated aromatic protons (H-3) at δ 3.57, 3.84, 6.69, 7.96 and 6.56 respectively. Signal at δ 3.78 was assigned to methine proton (H-6a, dd, J = 13.92, 4.76 Hz) in the α -orientation which displayed an axial-axial coupling with $\frac{1}{2}$ H-7 at δ 2.62 (dd, J = 13.92, 13.92 Hz). $\frac{1}{2}$ H-7 on the other hand also showed geminal coupling with the other $\frac{1}{2}$ H-7 at 2.74 (dd, J = 13.92, 4.76 Hz). This observation, hence placed the $\frac{1}{2}$ H-7 (δ 2.74) in the axial-equatorial position with H-6a. The rest of the signals belonged to two methylenes, in which all exist as geminal protons, were observed at δ 2.69, δ 3.01 (H₂-4), and δ 2.99, δ 3.37 (H₂-5).

The ^{13}C NMR indicated 18 resonances which assignable to two methoxyls (δ 56.7 and 60.5), four oxygenated aromatic carbons (δ 151.4, 147.4, 144.7 and 148.1) which ascribable to two phenolic hydroxy and two methoxyl carbon respectively, and five quarternary aromatic carbons at δ 129.6, 129.7, 124.7, 127.9 and 125.3. The remaining signals belonged to three methine aromatic carbons (δ 115.6, 116.0 and 113.0), three methylenes (δ 28.2, 43.5 and 36.2) and one aliphatic carbon at δ 54.8.

The placement of substitution groups in the aporphine skeleton was confirmed by means of the NOESY and HMBC experiments. The methoxyl proton (δ 3.57) showed 3J interaction with C-1 (δ 144.7), thus placing its location at C-1. At the same time H-3(δ 6.56) also showed 3J interaction with C-1, hence placing the methoxyl (δ 3.57), H-3 and C-1 in one ring system. The same phenomena could be observed whereby another methoxyl (δ 3.84) showed 3J interaction with C-10 (δ 148.1), while H-8 (δ 6.69) also displayed 3J interaction with C-10. These observation suggested that the two methoxyls have to be located in two different ring systems. The NOE interactions observed between methoxyl at δ 3.57 with H-11 and between H-11 with another methoxyl at δ 3.84 suggested that H-11 was located between the two methoxyls in space, hence leaving only two vacant places for two hydroxyls which were at C-2 and C-9. Based on these spectral data and comparison with literature (Tewari *et al.* 1972), compound **2** was deduced as

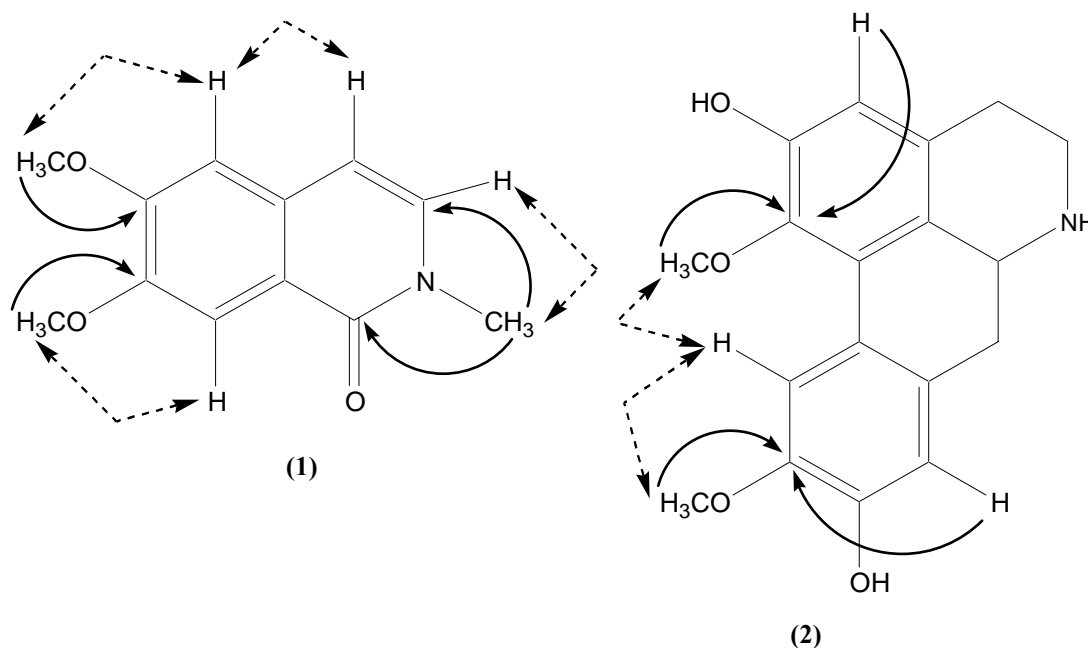


Figure 1 : NOESY () and HMBC () interactions observed in **1** and **2**

laurolitsine, which was also known as norboldine.

4. Acknowledgement

This work is financed by IRPA grant : 09-02-02-0086-EA 227.

5. References

Ahmat @ Abdul Hamid N., Latip, J., Said, I. M. and Din, L. B. 2005. *Malaysian J. Sci.* **24** : 33-36.

Burkill, I. H. 1966. A Dictionary of the Economic Products of Malaysia Peninsula. 2nd ed. Kuala Lumpur :112.

Cheng, J. C., Lie, C. L., Kuo, T. C. and Chieh, F. C. 1994. *J. Nat. Prod.* **57** (6) : 689-694.

Kametani, T., Kobari, T. and Takano, S. 1968. *Yakugaku Zashi.* **88** (6) : 774-778.

Lajis, N. H., Mahmud, Z., Din, L. B. and Toia, R. F. 1989. *Pertanika.* **12** : 421-424.

Lajis, N. H. and Mahmud, Z. 1991. *J. Nat. Prod.* **54** (2) : 612-614.

Mahmud, Z., Khan, M. N. and Lajis, N. H. 1992. *J. Nat. Prod.* **54** (4) : 533-535.

Norizan, A., Ikram, M. S., Jalifah, L. and Laily B. D. 2005. *Prosiding Seminar Sebatian Semulajadi ke 20, 2005.* In Press.

Sangster, A. W. and Stuart, K. L. 1965. *Chem. Rev.* **65.** 69-72.

Shamma, M. 1960. *Experientia.* **16.** 484-488.

Tewari, S., Bhakuni, D. S. and Dhar, M. M. 1972. *Phytochem.* **11** : 1149-1152.

Sintesis, Pencirian dan Aktiviti Biologi Sebatian Trifenilstanum(IV) Ditiokarbamat

Normah Awang ¹⁾, Ibrahim Baba ²⁾, Yang Farina Abd. Aziz ³⁾ dan Bohari M. Yamin ⁴⁾

- 1) Program Kesihatan Persekitaran, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu
Universiti Kebangsaan Malaysia, 50303 Jalan Raja Muda Abd. Aziz,
Kuala Lumpur, Malaysia
e-mail: normah_69@yahoo.com
- 2) Program Kimia, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi,
Selangor, Malaysia
e-mail: aibi@pkisc.cc.ukm.my
- 3) Program Kimia, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi,
Selangor, Malaysia
e-mail: farina@pkisc.cc.ukm.my
- 4) Program Kimia, Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi,
Selangor, Malaysia
Email: bob@pkisc.cc.ukm.my

Abstrak

Empat sebatian baru trifenilstanum(IV) ditiokarbamat yang berformula $(C_6H_5)_3Sn[S_2CNR'R'']$ ($R' = CH_3, C_2H_5, iC_3H_7, s-C_4H_9$; $R'' = C_6H_{11}, C_3H_7$) telah berjaya disediakan melalui kaedah in-situ. Spektrum inframerah telah menunjukkan kehadiran tiga jalur penting hasil regangan ikatan $C \equiv N$, $C \equiv S$ dan $Sn-S$ masing-masing pada julat $1475-1478\text{ cm}^{-1}$, $976-998\text{ cm}^{-1}$ dan $346-376\text{ cm}^{-1}$. Spektrum RMN ^{13}C pula menunjukkan kehadiran signal hasil resonans atom karbon karbamat pada moeiti NCS_2 pada julat 195.18-198.25 ppm. Kajian kristalografi sinar-X pula menunjukkan mod pengkelatan kumpulan ditiokarbamat dalam sebatian adalah sama ada secara bidentat atau isobidentat. Analisis termogravimetri pula mendapati sebatian stabil secara terma pada suhu di bawah $130^\circ C$. Sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat ini menunjukkan aktiviti sitotoksik yang tinggi terhadap sel leukemia manusia HL-60 dengan nilai CD_{50} berada pada julat $0.17-0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$. Ujian aktiviti antimikrob pula mendapati sebatian menunjukkan aktiviti yang sederhana terhadap mikrob ujian yang tertentu dengan diameter zon perencatan pertumbuhan mikrob ialah 8-10 mm.

Kata kunci: aktiviti antimikrob, mod pengkelatan, ditiokarbamat, trifenilstanum

1. Pendahuluan

Kajian terhadap sebatian organostanum ditiokarbamat masih berterusan kerana kepelbagaian struktur dan aktiviti biologinya (Sharma *et al.* 1996). Sebatian fenilstanum ditiokarbamat telah mula disediakan pada tahun 1965 oleh Kupchik & Calabretta. Kebanyakan kajian kristalografi sinar-X terhadap sebatian

organostanum ditiokarbamat menunjukkan kebanyakan ligan ditiokarbamat telah berikat secara tidak simetri terhadap atom pusat stanum (Hibbert *et al.* 1999). Dalam kajian ini, kami akan melaporkan sintesis, pencirian dan aktiviti biologi sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat yang berformula $(C_6H_5)_3Sn[S_2CNR'R'']$ ($R' = CH_3, C_2H_5, iC_3H_7,$

$s\text{-C}_4\text{H}_9$; $R'' = \text{C}_6\text{H}_{11}, \text{C}_3\text{H}_7$). Di samping itu juga struktur hablur sebatian ini akan dibincangkan juga.

2. Percobaan

Bahan Kimia

N-metilsikloheksilamina, *N*-etilsikloheksilamina, isopropilsikloheksilamina dan trifenilstanum(IV) klorida diperoleh secara komersial yang dibekalkan oleh Fluka sementara *N*-sek-butyl-*N*-propilamina pula dibekalkan oleh TCI-EP. Karbon disulfida dibekalkan oleh Fisher sementara kloroform dan etanol dibekalkan oleh Merck. Kesemua bahan kimia dan pelarut digunakan tanpa dilakukan sebarang penulenan.

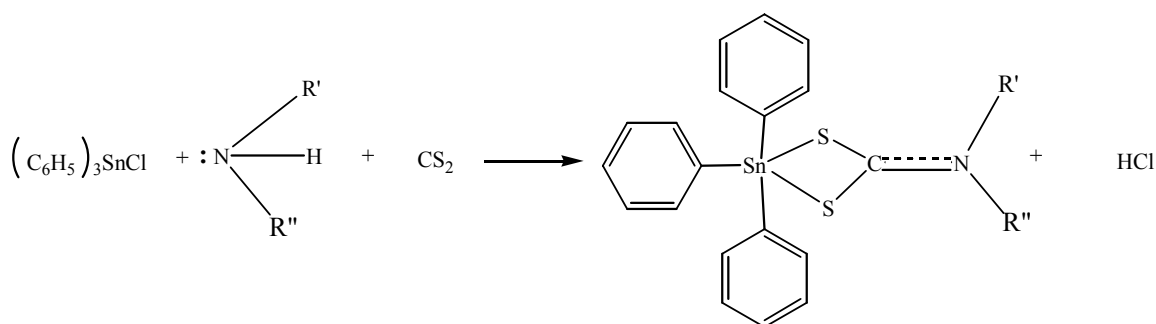
Kaedah

Sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat disediakan dengan menambahkan secara perlahan-lahan karbon disulfida (30 mmol) dalam 10 ml etanol ke dalam 30 mmol larutan amina sekunder (*N*-metilsikloheksilamina, *N*-etilsikloheksilamina, *N*-isopropilsikloheksilamina dan *N*-sek-butyl-*N*-

propilamina) dalam pelarut etanol (30 ml) yang disejukkan dalam takung ais. Suhu campuran tindak balas dikawal supaya tidak melebihi 4°C dan dikacau selama setengah jam. Larutan kuning pucat yang terhasil akhirnya ditambahkan secara stoikiometri sebatian trifenilstanum(IV) klorida yang dilarutkan dalam 20 ml etanol. Campuran tindak balas dikacau menggunakan pengacau bermagnet dan selepas beberapa minit, mendakan terhasil. Selepas 1 jam dibiarkan bertindak balas, mendakan yang terhasil akhirnya dituras dan dibilas beberapa kali menggunakan etanol sejuk dan dikeringkan dalam balang pengering menggunakan silika gel. Penghabluran semula sebatian menggunakan campuran pelarut kloroform dan etanol dengan nisbah isipadu 1:1 dilakukan dan pemeruapan secara perlahan-lahan larutan sebatian pada suhu bilik telah berjaya menghasilkan hablur yang tidak berwarna untuk dua daripada empat kompleks yang telah disediakan.

Pencirian

Pencirian sebatian seperti penentuan takat lebur



$R' = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, i\text{C}_3\text{H}_7, s\text{-C}_4\text{H}_9$; $R'' = \text{C}_6\text{H}_{11}, \text{C}_3\text{H}_7$

Rajah 1. Tindak balas di antara trifenilstanum(IV) klorida, amina sekunder dan karbon disulfida

Jadual 1. Data sifat fizikal dan analisis unsur sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat

Bil.	Sebatian	Warna	Hasil	Takat lebur	Peratus unsur				
					C	H	N	S	Sn
1	(Ph) ₃ Sn(MecHexDtc)	Putih	76	136.8-	57.71	4.98	2.57	11.26	23.05
				138.2	57.99	5.39	2.60	11.90	22.12
2	(Ph) ₃ Sn(MecHexDtc)	Putih	68	153.5-	59.13	5.48	2.43	11.54	23.25
				155.2	58.70	5.62	2.54	11.59	21.55
3	(Ph) ₃ Sn(<i>i</i> PrHexDtc)	Putih	64	136.0-	59.38	5.40	2.58	11.97	22.78
				138.4	60.43	4.14	2.52	11.51	21.40
4	(Ph) ₃ Sn(<i>s</i> -BuPrDtc)	Putih	82	111.9-	57.36	5.62	2.66	11.16	23.48
				113.4	57.78	5.74	2.59	11.85	22.04

Petunjuk: huruf yang digelapkan ialah nilai teori

kompleks dilakukan menggunakan alat Electrothermal IA 9100. Analisis kandungan unsur karbon, hidrogen, nitrogen dan sulfur dilakukan menggunakan alat CHNS model Fison EA 1108 manakala peratus logam ditentukan melalui analisis gravimetri. Spektrum inframerah dirakam menggunakan alat spektrofotometer Perkin Elmer Model GX; sebagai cakera KBr untuk julat 4000 - 370 cm^{-1} dan polietilena untuk julat 400 - 300 cm^{-1} . Spektrum resonans magnet ^{13}C pula dirakamkan menggunakan alat spektrofotometer Joel JNM-LA 400 dan kristalografi sinar-X dilakukan menggunakan alat difraktometer Bruker SMART APEX yang ada di di Pusat Pengajian Sains Kimia dan Tekonologi Makanan, UKM.

3. Hasil dan Pembahasan

Empat sebatian baru trifenilstanum(IV) ditiokarbamat telah berjaya disediakan melalui kaedah tindak balas penyelitan di antara amina sekunder yang berkaitan dengan trifenilstanum(IV) klorida di samping kehadiran karbon disulfida. Hasil yang

diperoleh melebihi 60% menunjukkan kaedah yang digunakan iaitu kaedah tindak balas penyelitan adalah sesuai untuk menyediakan sebatian trifenilstanum(IV) ini. Skema tindak balas untuk sintesis sebatian ini ditunjukkan dalam Rajah 1.

Kesemua sebatian wujud sebagai mendakan yang berwarna putih pada awalnya tetapi dilakukan proses penghabluran semula bagi menghasilkan hablur menggunakan campuran pelarut kloroform dan etanol dengan nisbah isipadu 1:1. hablur yang terhasil adalah tanpa warna dan dilakukan kajian kristalografi sinar-X bagi penentuan struktur masing-masing. hablur sebatian ini juga didapati stabil terhadap atmosfera pada suhu bilik. Data analisis unsur karbon, hidrogen, nitrogen, sulfur dan stanum didapati bersetuju dengan formula yang dicadangkan. Data sifat fizikal dan analisis unsur ditunjukkan dalam Jadual 1.

Spektrum inframerah untuk keempat-empat kompleks menunjukkan kehadiran tiga jalur penting iaitu $\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu(\text{C}=\text{S})$ dan $\nu(\text{M}-\text{S})$ (Jadual 2) yang menjadi ciri sebatian

Jadual 2. Jalur penting serapan inframerah sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat (cm^{-1})

Bil.	Sebatian	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\nu(\text{Sn}-\text{S})$
1	(Ph) ₃ Sn(MecHexDtc)	1478s	979m	377s
2	(Ph) ₃ Sn(EtcHexDtc)	1475s	998m	375s
3	(Ph) ₃ Sn(<i>i</i> PrcHexDtc)	1479s	978w	371s
4	(Ph) ₃ Sn(<i>s</i> -BuPrDtc)	1475s	976s	346s

Petunjuk: s = kuat; m = sederhana kuat; w = lemah

Jadual 3. Data penting spektrum RMN ^{13}C sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat (δ , ppm)

Sebatian	N^{13}CS_2	$\text{R}^2 = \text{C}_6\text{H}_{11}$, <i>s</i> - C_4H_9)	$\text{Sn}-\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{N}-\text{R}^1(\text{R}^1 = \text{CH}_3,$ $\text{C}_2\text{H}_5, \textit{i}\text{C}_3\text{H}_7,$ $\text{C}_3\text{H}_7)$
1	196.29	65.32	142.81	36.73
		30.04	136.71	
		25.37	128.44	
		25.27	128.36	
		25.27	128.36	
2	195.18	65.86	143.17	44.95
		30.69	136.95	14.11
		25.60	128.73	
		25.32	128.42	
		25.32	128.42	
3	198.25	66.65	138.00	51.38
		29.74	129.00	19.97
		25.65	128.19	15.64
		25.29	125.25	
		25.29	125.25	
4	196.22	63.60	143.24	50.88
		28.04	136.74	18.33
		21.79	128.98	11.38
		11.07	128.48	
		11.07	128.48	

Jadual 4. Data hablur dan parameter penghalusan sebatian 1-4

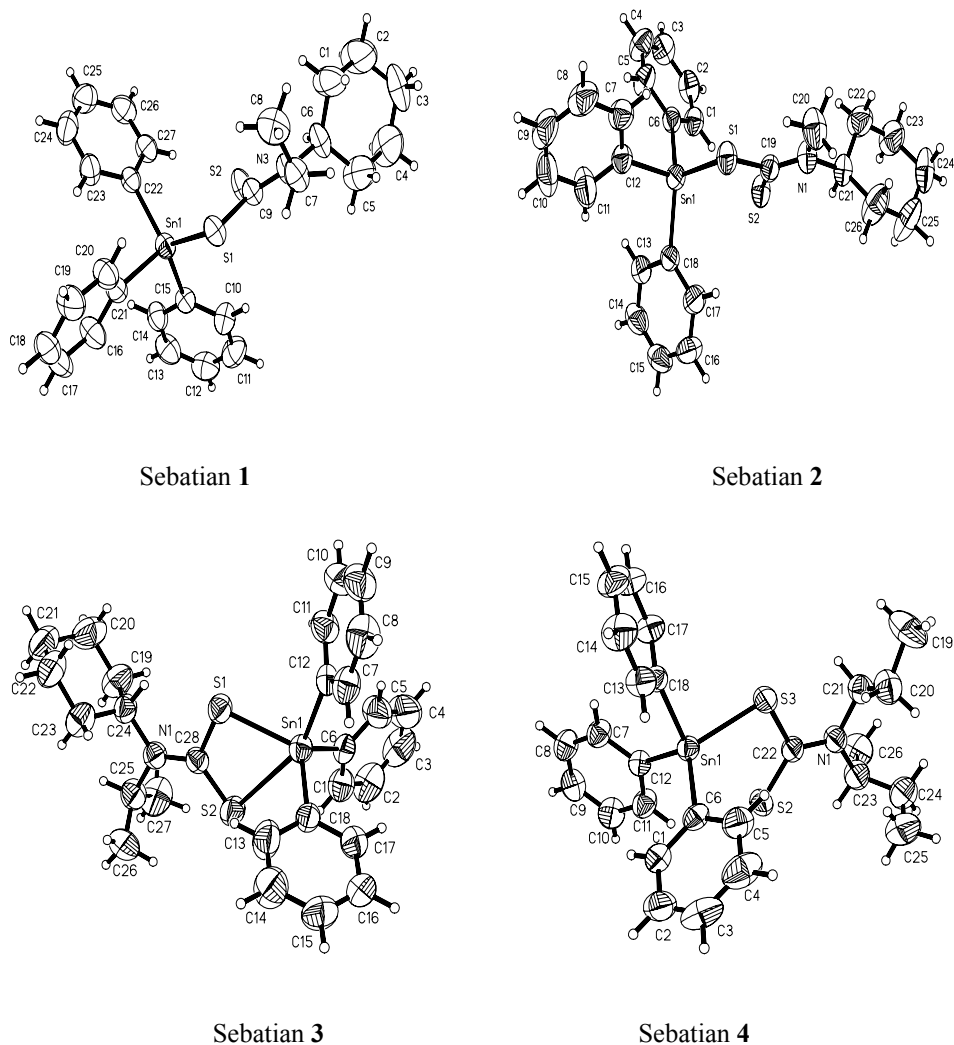
Sebatian	1	2	3	4
Formula empirik	C ₂₆ H ₂₉ NS ₂ Sn	C ₂₇ H ₃₁ NS ₂ Sn	C ₂₈ H ₃₂ NS ₂ Sn	C ₂₆ H ₃₁ NS ₂ Sn
Berat molekul	538.31	552.34	556.28	540.33
Sistem hablur	Triclinic	Trilinic	Ortorhombic	Monoklinik
Kumpulan ruang	P-1	P-1	Pccn	C2/c
<i>a</i> (Å)	9.7951(17)	10.036(2)	15.7553(9)	14.813(4)
<i>b</i> (Å)	11.342(2)	11.435(3)	29.9114(15)	12.204(4)
<i>c</i> (Å)	11.952(2)	11.989(3)	11.6498(6)	28.910(9)
α (°)	75.037(3)	105.586(4)	90	90
β (°)	75.962(3)	105.443(4)	90	97.14(6)
γ (°)	89.058(3)	90.646(4)	90	90
V (Å ³)	1242.9(4)	1272.4(5)	5490.1(5)	5186(3)
Z	2	2	9	8
D/Mgm ⁻³	1.438	1.442	1.514	1.384
μ (mm ⁻¹)	1.209	1.183	1.234	1.159
F (000)	548	564	25202208	
Warna	Tak berwarna	Tak berwarna	Tak berwarna	Tak berwarna
Saiz hablur (mm)	0.53 x 0.42 x 0.26	0.35 x 0.26 x 0.51	0.33 x 0.21 x 0.05	0.31 x 0.28 x 0.25
Suhu (K)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Julat θ (°)	1.82 – 27.64	1.84 – 27.50	1.36 – 27.53	1.42–27.45
Julat indeks ($\pm h, \pm k, \pm l$)	-12/12,-14/14,-15/15	-13/13, -14/14,-15/15	-51/20, -38/32,-15/43	-19/17,-14/15,-34/37
Pemantulan terkumpu	1	15537	16186	17222
Pemantulan bebas	5658 [R _{int} = 0.0201]	5793 [R _{int} = 0.0224]	6324 [R _{int} = 0.0214]	5926 [R _{int} = 0.0197]
Final R indices $I > 2\sigma(I)$	R ₁ = 0.0253, wR ₂ = 0.0695	R ₁ = 0.0256, wR ₂ = 0.0717	R ₁ = 0.0522, wR ₂ = 0.1028	R ₁ = 0.0325, wR ₂ = 0.0774
R indices (semua data)	R ₁ = 0.0268, wR ₂ = 0.0706	R ₁ = 0.0271, wR ₂ = 0.0730	R ₁ = 0.0839, wR ₂ = 0.1141	R ₁ = 0.0383, wR ₂ = 0.0805
Puncak terbesar dan terkecil (e Å ⁻³)	0.539 & -0.419	0.726 & -0.41	0.721 & -0.383	0.707& -0.294

ditiokarbamat. Jalur serapan yang kuat pada julat 1475-1479 cm⁻¹ hasil getaran ikatan C-N yang dikenali juga sebagai jalur “tioureida” (Bonati & Ugo, 1967). Ikatan ini mempunyai ciri-ciri ikatan separa ganda dua. Manakala jalur serapan yang lemah pada julat 976-998 cm⁻¹ adalah hasil getaran ikatan C-S. Kehadiran jalur serapan tunggal $\nu(\text{C}=\text{S})$ ini menunjukkan ciri-ciri bidentat ligan ditiokarbamat (Sharma *et al.* 1981). Keputusan ini disokong oleh data hasil kajian kristalografi sinar-X yang menunjukkan bahawa ligan ditiokarbamat telah mengkelat secara bidentat dalam sebatian 1-4. Pembentukan ikatan di antara logam stanum dengan ligan ditiokarbamat dapat dibuktikan dengan kehadiran jalur serapan pada julat 346-377 cm⁻¹

iaitu merupakan frekuensi regangan ikatan Sn-S.

Spektrum RMN ¹³C untuk semua sebatian pula menunjukkan kehadiran signal yang paling penting untuk sebatian ditiokarbamat iaitu anjakan kimia karbon karbamat, N¹³CS₂ pada julat 195.18- 198.25 ppm (Jadual 3). Manakala signal pada julat 66.65-25.32 ppm pula adalah merupakan anjakan kimia karbon sikloheksil untuk sebatian 1-3 (Hall & Tiekink 1998).

Kajian kristalografi sinar-X keempat-empat sebatian telah dilakukan dengan memilih hablur yang sesuai. Data hablur dan penghalusan bagi sebatian 1-4 ditunjukkan dalam Jadual 4. Hablur sebatian 1 dan 2 didapati bersistem monoklinik dengan kumpulan ruang yang sama iaitu *P-1*. Manakala sebatian 3 dan 4 didapati



Rajah 2. Plot ORTEP sebatian 1, 2, 3 dan 4 pada paras kebarangkalian 50 %

mempunyai sistem hablur ortorombik dan monoklinik dengan kumpulan ruang masing-masing ialah *Pccn* dan *C2/c*.

Banyak sebatian stanum ditiokarbamat telah dilaporkan strukturnya. Namun begitu hanya satu sebatian trifenilstanum dengan ligan ditiokarbamat yang tidak simetri yang pernah dilaporkan strukturnya iaitu trifenilstanum(IV) metilbutilditiokarbamat (Kana *et al.* 2001). Rajah 2-5 menunjukkan plot ORTEP bagi sebatian 1-4 yang menunjukkan ligan ditiokarbamat mengkelat secara isobidentat bagi sebatian 1, 2 dan 4 manakala untuk sebatian 3, pengkelatan ligan ditiokarbamat adalah secara bidentat. Pengkelatan ligan ditiokarbamat secara isobidentat bagi sebatian 1, 2 dan 4 adalah disebabkan dengan kehadiran ikatan Sn \cdots S yang lemah dengan panjang

ikatannya ialah 2.9426(10)-3.0134 Å. Struktur molekul bagi sebatian 1-4 adalah didapati hampir sama dengan sebatian trifenilstanum(IV) yang lain iaitu $\text{Ph}_3\text{Sn}[\text{S}_2\text{CN}(\text{CH}_3)(\text{C}_4\text{H}_9)]$ (Kana *et al.* 2001) dan $\text{Ph}_3\text{Sn}[\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]$ (Carr & Lindley 1974). Geometri molekul bagi sebatian 1, 2 dan 4 adalah didapati berada di antara tetrahedral dan bipiramid trigon disebabkan oleh kehadiran interaksi intramolekul Sn \cdots S yang lemah. Ikatan ini didapati jauh lebih panjang jika dibandingkan dengan panjang ikatan kovalen Sn-S iaitu 2.44 Å.

Atom pusat stanum dalam sebatian 3 pula didapati berkoordinat lima dengan panjang dua ikatan Sn-S masing-masing ialah Sn(1)-S(1) = 2.4655(10) and Sn(1)-S(2) = 2.9262(11) Å. Geometri molekul sebatian 3 ini ialah

Jadual 5. Data analisis termogravimetri sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat

Sebatian	Julat suhu penguraian (°C)
TriPhSn(MeCyhexDtc)	233-375
TriPhSn(EtCyhexDtc)	134-373
TriPhSn(<i>i</i> PrCyhexDtc)	252-398
TriPhSn(<i>s</i> -BuPrDtc)	221-389

Jadual 6. Ujian awal aktiviti sitotoksik sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat terhadap sel leukemia manusia jenis “promyelocetic”, HL₆₀

Sebatian	CD ₅₀ (µg/mL) HL-60, Sel Leukemia “Promyelocetic”
TriPhSn(MeCyhexDtc)	0.18
TriPhSn(EtCyhexDtc)	0.25
TriPhSn(<i>i</i> PrCyhexDtc)	0.22
TriPhSn(<i>s</i> -BuPrDtc)	0.17
“Etoposide” (kawalan positif)	0.60

Jadual 7. Ujian awal aktiviti antimikrob sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat

Sebatian	Diameter zon perencatan (mm)			
	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B. subtilis</i>
TriPhSn(MeCyhexDtc)	8	-	10	-
TriPhSn(EtCyhexDtc)	-	-	-	10
TriPhSn(<i>i</i> PrCyhexDtc)	9	-	9	-
TriPhSn(<i>s</i> -BuPrDtc)	8	10	-	-
Streptomysin (standard)	19	20	15	20

bipiramid trigon terherot dengan sudut ikatan pada paksi axialnya ialah 156.22(10)^o iaitu jauh lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai sudut yang normal iaitu 180^o. Panjang ikatan N(1)-C(28) ialah 1.319(5) Å iaitu lebih pendek jika dibandingkan dengan nilai panjang ikatan N-C tunggal iaitu 1.47 Å (Carr & 1974). Ini menunjukkan bahawa ikatan N-C tersebut mempunyai ciri-ciri ikatan ganda dua. Data ini dapat menyokong keputusan hasil analisis inframerah.

Ujian kestabilan terma dalam atmosfera nitrogen yang dilakukan melalui analisis termogravimetri menunjukkan sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat ini adalah stabil di bawah suhu 130 °C. Jadual 5 menyenaraikan data analisis termogravimetri yang dilakukan. Data yang ditunjukkan merupakan julat suhu penguraian keempat-empat sebatian ini. Berdasarkan jadual tersebut, sebatian 1-4 didapati mula mengurai pada julat

suhu 134-252 °C. Ini menunjukkan sebatian ini adalah selamat dan sesuai disimpan pada suhu bilik.

Aktiviti biologi seperti ujian aktiviti sitotoksik yang dilakukan terhadap sel leukemia manusia jenis “promyelocetic”, HL-60 menunjukkan sebatian trifenilstanum(IV) ini mempunyai aktiviti yang sangat baik dengan nilai CD₅₀ pada julat 0.17-0.25 µg/mL (Jadual 6). Sebatian yang mempunyai nilai CD₅₀ < 5.0 µg/mL dikategorikan sangat aktif (Ali *et al.* 1996). Keputusan ujian aktiviti sitotoksik ini menunjukkan sebatian mempunyai potensi sebagai agen antikanser yang baik. Sementara itu, ujian awal aktiviti antimikrob menunjukkan sebatian adalah sederhana aktif terhadap mikroba yang tertentu. Diameter zon perencatan mikroba yang diperolehi adalah berada pada julat 8-10 mm (Jadual 7). Keputusan ini juga mendapati sebatian trifenilstanum(IV)

ditiokarbamat ini juga berpotensi bertindak sebagai agen antimikrob.

4. Kesimpulan

Data analisis unsur, analisis spektroskopi inframerah dan spektroskopi RMN ^{13}C di samping kajian kristalografi sinar-X menunjukkan sebatian trifenilstanum(IV) ditiokarbamat yang berformula $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Sn}[\text{S}_2\text{CNR}'\text{R}'']$ ($\text{R}' = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, i\text{C}_3\text{H}_7, s\text{-C}_4\text{H}_9$; $\text{R}'' = \text{C}_6\text{H}_{11}, \text{C}_3\text{H}_7$) telah berjaya disintesis menggunakan kaedah *in-situ*. Stoikiometri di antara sebatian trifenilstanum dengan ligan ditiokarbamat adalah 1:1 dan pengkelatan ligan adalah secara isobidentat atau bidentat.

5. Ucapan Terimakasih

Terima kasih diucapkan kepada Kerajaan Malaysia di atas bantuan kewangan melalui geran IRPA 09-02-02-0048-EA144 yang membolehkan penyelidikan ini berjalan dengan lancar. Tidak lupa juga penghargaan kepada semua pembantu makmal di Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi UKM yang membantu di sepanjang penyelidikan ini dijalankan.

6. Daftar Pustaka

Ali, A. M., Mackeen, M. M., Safinar, I. I., Hamid, M., Lajis, N. H., El-sharkawy, S. H. & Murakoshi, M. (1996). Antitumour-promoting and antitumor activities of the crude extract from the leaves of *Juniperus chinensis*. *J. Ethnopharmacology*, **53**, 165-169.

Bonati, F & Ugo, R. (1967). Organotin(IV) *N,N*-disubstituted dithiocarbamates. *J. Organomet. Chem.*, **10**, 257-268.

Hall, V. J. & Tiekink, R. T. (1998). The importance of varying the Lewis acidity of R_2Sn in determining the molecular structure of $\text{R}_2\text{Sn}(1,1\text{-dithiolate})$ compounds: The crystal and molecular structures of three divinyltin *N, N*-dialkyldithiocarbamates. *Main Group Met. Chem.*, **21**(5), 245-254.

Hibbert, T. G., Mahon, M. F. & Molloy, K. C. (1999). Organotin dithiocarbamate chlorides: X-Ray structures of *n*-BuSn(S_2CNEt_2) Cl_2 and *n*-BuSn(S_2CNEt_2) $_2\text{Cl}$. *Main Group Met. Chem.*, **22**(4), 235-241.

Kana, A. T., Hibbert, T. G., Mahon, M. F., Molloy, K. C., Parkin, I. P. and Price, L. S. (2001). Organotin unsymmetric dithiocarbamates: synthesis, formation and characterization of tin(II) sulfide films by atmospheric pressure chemical vapour deposition. *Polyhedron*, **20**, 2989-2995.

Lindley, P. F. & Carr, P. (1974). Crystal and molecular structure of bis(*N,N*-diethyldithiocarbamato)diphenylstannane, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{S}_4\text{Sn}$. *J. Cryst. Mol. Struct.*, **4**, 173-185.

Sharma, J., Singh, Y., Bohra, R. & Rai, A. K. (1996). Synthesis and spectral studies of diorganotin heterocyclic dithiocarbamate complexes: The crystal structure of $(\text{CH}_3)_2\text{Sn}[\text{S}_2\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]_2$. *Polyhedron*, **15**(7), 1097-1102.

Sharma, C. P., Kumar, N., Khandpal, M. C., Chandra, S. & Bhide, V. G. (1981). Studies on the preparation and characterization of bis-dithiocarbamate derivatives of di-*n*-butyl- and di-*n*-hexylSn(IV). *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **43**, 923-930.

Senyawa Flavon Terisoprenilasi dan Steroid Dari Kayu Akar Cempedak Jantan (*Artocarpus heterophyllus*)

Nurlelasari*, Euis H. Hakim*, Yana. M. Syah*, Lia D. Juliawaty*, Sjamsul A. Achmad*,
Lukman Makmur*

*Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia,
Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10, Bandung 40132, Indonesia.

Abstrak

Dua flavon terisoprenilasi, yaitu artokarpin (**1**) dan kudraflavon C (**2**), bersama-sama dengan satu steroid, β -sitosterol (**3**) telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kayu akar cempedak jantan (*Artocarpus heterophyllus*). Struktur ketiga senyawa tersebut telah ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV dan IR, serta melalui perbandingan spektrum data spektroskopi, putaran optik, dan titik leleh terhadap data senyawa yang sama yang telah dilaporkan.

Kata kunci : β -Sitosterol, artokarpin, kudraflavon C, *Artocarpus heterophyllus*.

1. Pendahuluan

Artocarpus heterophyllus adalah salah satu dari 50 spesies tumbuhan genus *Artocarpus* dalam famili Moraceae yang tersebar mulai dari India, Cina Selatan, Semenanjung Malaysia sampai kepulauan Solomon (Jarret, 1959). Tumbuhan ini dikenal di masyarakat dengan nama cempedak jantan.

Beberapa genus Moraceae yaitu *Morus*, *Ficus*, *Cudrania*, *Castilla*, *Canabis*, *Brossonetia*, *Antiaris* dan *Artocarpus* telah diteliti kandungan kimianya. Hasil menunjukkan bahwa tumbuhan Moraceae kaya akan senyawa fenolik seperti flavonoid, santon, stilben, 2-arilbenzopuran dan aduk diels alder. Kandungan kimia dari genus *Artocarpus* (Moraceae) mempunyai ciri yaitu senyawa fenolik terisoprenilasi (Nomura, 1998) yang memperlihatkan aktivitas sitoksik terhadap sejumlah sel tumor tertentu (Achmad, S.A, 1999). Selain itu *Artocarpus* juga mengandung senyawa nonfenolik seperti steroid dan triterpenoid, sedangkan alkaloid sedikit sekali ditemukan (Hegnauer, 1969 dan Nomura, 1998). Pada kesempatan ini akan dilaporkan isolasi dua senyawa flavon terisoprenilasi yaitu artokarpin (**1**) dan kudraflavon C (**2**), dan senyawa steroid, β -sitosterol (**3**), dari ekstrak

metanol kayu akar cempedak jantan (*Artocarpus heterophyllus*). Struktur ketiga senyawa ini ditetapkan berdasarkan data spektroskopi, serta perbandingan dengan senyawa standar.

2. Percobaan

Umum. Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat ukur titik leleh mikro Fisher-John yang tidak dikoreksi, spektrum UV dan IR masing-masing diukur dengan spektrofotometer Varian Cary 100 Conc UV-Visible dan Spectrum One Perkin Elmer FTIR. Kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi radial dilakukan dengan menggunakan silika gel Merck PF₂₅₄, sementara kromatografi lapis tipis (KLT) dikerjakan dengan pelat aluminium berlapis silika gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄, 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan adalah berkualitas teknis yang didestilasi. Larutan 1,5% Ce(SO₄)₂ dalam 2N H₂SO₄ digunakan sebagai pereaksi penampak noda.

Bahan Tumbuhan. Kayu akar cempedak jantan dikumpulkan dari daerah Bogor, Jawa Barat pada bulan Juni 2004 dan telah diidentifikasi di Herbarium Bandungense, Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung. Spesimen tumbuhan ini disimpan di

herbarium tersebut.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kayu akar cempedak jantan sebanyak 1,2 kg diekstraksi dengan metanol pada temperatur kamar selama 3 kali berturut-turut, menghasilkan 38 g ekstrak metanol. Selanjutnya dilakukan 2 kali kromatografi vakum cair mempergunakan eluen n-heksan ; etil asetat yang secara berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya sehingga diperoleh lima fraksi utama A-E. Terhadap fraksi A 0,867 g dilakukan kromatografi radial (silika gel Merck PF₂₅₄; eluen n-heksan : etil asetat (7,5 : 2,5) menghasilkan senyawa β - sitosterol (4 mg) dan artokarpin (6 mg). Selanjutnya dari fraksi B dengan metodologi yang sama diperoleh senyawa kudraflavon C (26 mg).

Artokarpin (1), diperoleh sebagai kristal kuning pucat, t.l 174 - 178°C; UV(MeOH) χ_{maks} : 276, dan 324 (bahu) nm, (MeOH + NaOH) χ_{maks} : 279, dan 360 nm; IR (KBr) ν_{maks} : 3391 (OH), 2959 (C-H alifatik), 1642 (C=O), 1476, 1452, 1352 (cincin aromatik) cm^{-1} .

Kudraflavon C (2), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning kecoklatan, t.l 94-98°C; UV(MeOH) χ_{maks} : 262, dan 313 (bahu) nm, (MeOH + NaOH) χ_{maks} : 269, dan 360 nm; IR (KBr) ν_{maks} : 3361 (OH), 2913 (C-H alifatik), 1651 (C=O), 1564, 1463, 1358 (cincin aromatik) cm^{-1} .

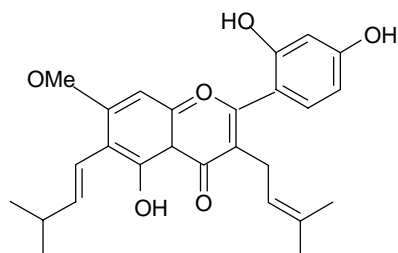
β - sitosterol (3), diperoleh sebagai kristal jarum berwarna putih, t.l 137-140°C; IR (KBr) ν_{maks} : 3438 (OH), 2937,2862 (C-H alifatik), 1464, 1383 (C=C) cm^{-1} , $[\alpha]_D^{22} -32^\circ$ (CHCl₃).

3. Hasil dan Pembahasan

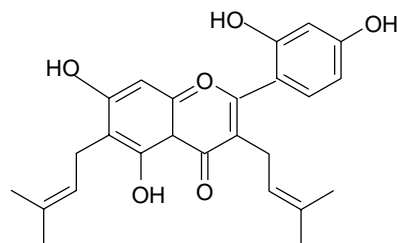
Senyawa 1 diperoleh sebagai kristal berwarna kuning pucat dengan titik leleh 174-178°C. Spektrum UV senyawa ini dalam metanol memberikan serapan maksimum pada χ_{maks} 324 (bahu) (pita I), dan pita 276 (pita II) nm. Pola

spektrum ini mengindikasikan flavon terisoprenilasi pada C-3 dimana sinamoil ditunjukkan pada χ 320-380 nm dan benzoil pada χ 240-270 nm. Intensitas yang rendah (bahu) untuk pita I mengindikasikan adanya gugus isoprenil pada C-3. Penambahan reagen geser NaOH memberikan pergeseran batokromik sebesar 36 nm pada pita I, yang menunjukkan adanya gugus OH bebas pada posisi C-4' di cincin B. Keberadaan gugus -OH ini didukung oleh spektrum IR senyawa 1 yang memperlihatkan adanya serapan pada 3391 cm^{-1} . Spektrum IR senyawa 1 juga memperlihatkan serapan untuk gugus fungsi utama dari suatu flavon yaitu serapan karbonil pada 1621 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C aromatik (1352-1476 cm^{-1}), sementara serapan untuk C-H alifatik untuk gugus isoprenil terlihat pada 2959 cm^{-1} . Data spektrum IR senyawa 1 tersebut ternyata identik dengan data yang sama dari artokarpin yang sebelumnya yang telah diisolasi dari tumbuhan *A. champeden* (Hakim, 1998). Bukti tambahan terhadap senyawa 1 diperoleh dari hasil perbandingan KLT antara senyawa 1 dengan senyawa artokarpin yang memperlihatkan nilai Rf yang sama pada tiga sistem eluen yang berbeda. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 adalah artokarpin.

Senyawa 2 diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning kecoklatan dengan titik leleh 94-98°C. Spektrum UV dalam metanol memberikan serapan maksimum pada χ_{maks} 262 dan 313 (bahu) nm, spektrum ini mengindikasikan suatu flavon dengan pita I (313 nm) dan pita II (262 nm). Seperti halnya dengan senyawa 1 pita 1 yang berupa bahu ini menunjukkan adanya substituen isoprenil pada posisi C-3 di cincin C. Penambahan reagen geser NaOH mengindikasikan bahwa senyawa 2 memiliki gugus hidroksi bebas pada C-4' yang ditunjukkan dengan adanya pergeseran batokromik dari pita I sebesar 47 nm. Spektrum



1



2

Tabel 1 Perbandingan data IR senyawa 1,2 dan literatur

Senyawa 1 (KBr)(cm-1)	Senyawa 1* (KBr) (cm-1)	Senyawa 2 (KBr) (cm-1)	Senyawa 2* (KBr) (cm-1)
3391	3348	3361	3200
2959	2959	2913	2963
2920	2927		2927
2862	2866	1651	1649
1642	1651	1564	1622
1621	1620	1463	1464
1476	1483	1358	
1452	1452		
1352	1352		
1317	1317		
1291	1292		
1243	1261		

* Artokarpin (Eliza,1998), Kudraflavon (Agustini, D.M, 1999).

IR dari senyawa ini memperlihatkan gugus fungsi utama dari suatu flavon, dimana gugus -C=O terkonjugasi muncul pada 1621 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C aromatik terlihat pada $1358\text{-}1564\text{ cm}^{-1}$, sementara serapan untuk gugus -OH terlihat pada 3361 cm^{-1} (lebar), selain itu serapan C-H alifatik tampak di daerah 2913 cm^{-1} yang memperkuat adanya gugus isoprenil pada senyawa ini. Dari analisis di atas disarankan bahwa senyawa hasil isolasi adalah suatu flavon terisoprenilasi pada posisi C-3. Perbandingan spektrum IR senyawa 2 dengan spektrum kudraflavon C ternyata keduanya adalah identik. Bukti lebih lanjut senyawa 2 sebagai kudraflavon C diperoleh dari perbandingan langsung dengan kudraflavon C standar pada analisis KLT.

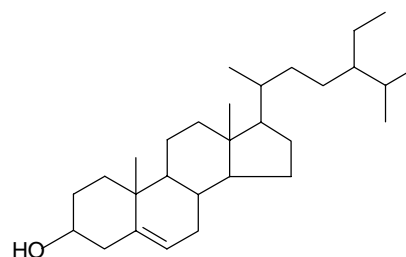
Adanya senyawa artokarpin dan kudraflavon C, dalam *Artocarpus*, mengindikasikan bahwa kedua senyawa ini merupakan prekursor dari sejumlah senyawa turunan flavon terisoprenilasi yang terdapat dalam genus ini. Beberapa genus *Artocarpus* yang telah dilaporkan menunjukkan adanya kedekatan secara kemotaksonomi dari *A. heterophyllus* dengan *A. champeden*, *A. glauca* dan *A. maingayi* (Hakim, 1998, Agustini, 1999 dan Eliza, 1998).

Senyawa 3 diperoleh sebagai kristal jarum berwarna putih dengan titik leleh $137\text{-}140^{\circ}\text{C}$. Spektrum IR dari senyawa ini menunjukkan adanya gugus -OH pada 3438 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C alkena ditunjukkan dengan adanya serapan pada $1383\text{-}1464\text{ cm}^{-1}$ sedangkan serapan -C-H alifatik tampak di daerah $2862\text{-}2937\text{ cm}^{-1}$. Bukti tambahan terhadap senyawa 3 diperoleh dari hasil perbandingan KLT antara

senyawa 3 dengan senyawa β - sosterol yang memperlihatkan nilai Rf yang sama pada tiga sistem eluen yang berbeda serta dilakukan pengujian putaran optik terhadap senyawa ini sehingga dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa 3 adalah β - sitosterol.

4 Kesimpulan

Dari fraksi metanol kayu akar cempedak jantan telah ditemukan dua senyawa flavon terisoprenilasi, yaitu artokarpin (1) dan kudraflavon C (2). Hasil uji biologis memperlihatkan bahwa kedua senyawa memiliki sifat sitotoksik yang kuat. Hal ini menunjukkan bahwa tumbuhan ini mempunyai potensi sebagai sumber bahan kimia yang bermanfaat. Bersama dengan kedua senyawa di atas ditemukan pula satu senyawa steroid, β -sitosterol (3).



3

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Herbarium Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung dan Staf karyawan yang telah mengidentifikasi tumbuhan tersebut.

6. Daftar Pustaka

Ahmad, S.A., *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.* (Indonesia), **2004**, 35-43

Ahmad, S.A; Hakim, E.H; Makmur, L; Mujahidin, D; Syah, Y.M. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam '99, 1999*, hal 1-9.

Agustini, D.M; Makmur, L; Achmad, S.A; Ghisalberti, E.L ; Hakim, E.L; Syah, Y.M. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam '99, 1999*, hal 198-204.

Eliza. “ *Artokarpin dan Turunannya dari Kayu Akar Artocarpus maingayi King*”, Tesis, Departemen Kimia , Institut Teknologi Bandung, **1998**.

Hakim, E.H; Marlina, E.V; Mujahidin, D; Achmad, S.A; Ghisalberti, E.L; Makmur, L. “*Artokarpin dan Heteroflavon A, dua senyawa Flavonoid bioaktif dari Artocarpus champeden*”, *Prosiding ITB, 1998*, 30 (1), 31-36.

Heugnauer, R., “ *Chemotaxonomie Der Pflanzen*”, Band S. Birkhauser Verlag Basel, Stuttgart, **1969**.

Hano, Y; Nomura T, “*Isoprenoid-Substituted Flavonoid From Artocarpus Plants (Moraceae)*”, *Heterocycles, 1998*, 47(2), 1779-1202

Struktur Produk Tindak Balas Bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)] Dengan BenzoilTiourea Terbitan Asid Amino

Nurziana Ngah, Bohari M. Yamin dan Mohammad B. Kassim

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia
Emel: nurziana_ngah@yahoo.com, bohari@pkrisc.cc.ukm.my, mbk@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Tindak balas bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)] biasanya melibatkan tindak balas penggantian kumpulan asetat oleh kumpulan karboksilat sebatian pengganti. Tindak balas bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)] dengan N-benzoil-N'-feniltiourea dalam etanol telah menghasilkan $[Ag(PPh_3)_3S]$. Produk yang sama juga diperolehi daripada tindak balas dengan asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik. Sebaliknya dalam kloroform kompleks dimer $[C_{47}H_{42}AgN_2O_3P_2S]_2$ terbentuk dan mempunyai sistem hablur triklinik dengan kumpulan ruang $P\bar{1}$, $a = 12.691(3)\text{\AA}$, $b = 13.080(3)\text{\AA}$, $c = 14.267(3)\text{\AA}$, $\alpha = 94.888(5)^\circ$, $\beta = 93.818(6)^\circ$ dan $\gamma = 97.254(5)^\circ$. Tindak balas dengan asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik dalam pelarut kloroform tidak membentuk kompleks yang setara tetapi dimer yang dihubungkan melalui jambatan NCS, $[C_{37}H_{30}AgN_2P_4S]_2$. Tindak balas dengan asid-2-(3-benzoiltiouredo)-3-metilbutirik dalam pelarut asetonitril pula menghasilkan kompleks polimerik $[C_{49}H_{45}AgN_2O_3P_2S] \cdot CH_3CN$. hablur yang diperolehi mempunyai sistem ortorombik dengan kumpulan ruang $P2_12_12_1$, $a = 14.665(3)\text{\AA}$, $b = 15.475(3)\text{\AA}$, $c = 21.024(4)\text{\AA}$.

Kata kunci: Bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)], asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik, asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik, asid-2-(3-benzoiltiouredo)-3-metilbutirik.

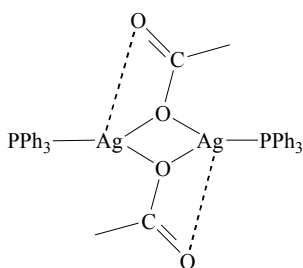
1. Pendahuluan

Secara umumnya, tindak balas kompleks bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)] (**I**) (Rajah 1) melibatkan tindak balas gantian kumpulan asetat oleh kumpulan karboksilat sesuatu sebatian pengganti. Daripada tindak balas ini, pelbagai jenis kompleks Ag:PPh₃ yang berbeza boleh terhasil. Sebagai contoh, tindak balas dengan asid-2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik, asid-3,5-dinitrobenzoik dan tiosemikarbazida masing-masing telah menghasilkan bis[2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoato(trifenilfosfin)argentum(I)] (Othman et al. 2000a), $[(Ag(PPh_3)_2(C_7H_3N_2O_6))]_2$ (Othman et al. 2000b) dan $[Ag(PPh_3)_3NCS] \cdot CH_3Cl$ (Othman et al. 1996). Dalam kajian awal, sebatian (**I**) didapati bertindak balas dengan N-benzoil-N'-feniltiourea menghasilkan $[Ag(PPh_3)_3S]$ yang menunjukkan pemutusan ikatan C=S berlaku. Sebatian benzoiltiourea terbitan asid amino mempunyai kumpulan tiono (C=S) dan

karboksilik (COOH). Struktur molekul tersebut menyajikan beberapa kemungkinan samada berlaku penggantian kumpulan karboksilik pada kumpulan asetat sebatian (**I**), pemutusan ikatan C=S ligan membentuk ikatan Ag-S atau pengkompleksan melalui pengkelatan pada atom O dan S. Kertas ini membincangkan keputusan kajian sebatian (**I**) dengan asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik, asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik dan asid-2-(3-benzoiltiouredo)-3-metilbutirik. Produk tindak balas yang terhasil dikaji menggunakan teknik analisis kristalografi sinar-X.

2. Percobaan

Sebatian (**I**) disediakan menindakbalaskan campuran 1:1 bilangan mol argentum(I) asetat dengan trifenilfosfin dalam pelarut toluene pada suhu didih [Blues et al. 1977; Ng & Othman (1997)] dan benzoiltiourea terbitan asid amino dilakukan mengikut kaedah yang dilaporkan oleh Yusuf & Yamin (2003). Tindak



RAJAH 1 Struktur bis[asetato(trifenilfosfin)argentum(1)]

balas pengkompleksan benzoiltiourea terbitan asid amino dengan (I) dilakukan pada nisbah mol 2:1. Untuk tindak balas dengan terbitan asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik dengan (I), pelarut yang digunakan adalah etanol. Kedua-dua bahan dilarutkan dalam etanol dan dipanaskan selama 10 minit sehingga larutan jernih terbentuk. Filtrat yang terhasil dibiarkan menyejat pada suhu bilik. Tindak balas yang sama diulang dalam pelarut kloroform. Dalam larutan kloroform, larutan didapati menjadi likat dan dicairkan dengan sedikit aseton dan etanol. Dalam tindak balas (I) dengan asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik, pelarut kloroform digunakan. Kaedah yang digunakan sama seperti dalam tindak balas dengan asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik. Tindak balas (I) dengan asid-2-(3-benzoiltiouredo)3-metilbutirik dilakukan dalam pelarut asetonitril. Campuran kedua-dua bahan dalam pelarut asetonitril dikacau selama 1 jam sehinggalah larutan jernih tanpa warna terbentuk. Campuran dituras dan filtrat dibiarkan menyejat pada suhu

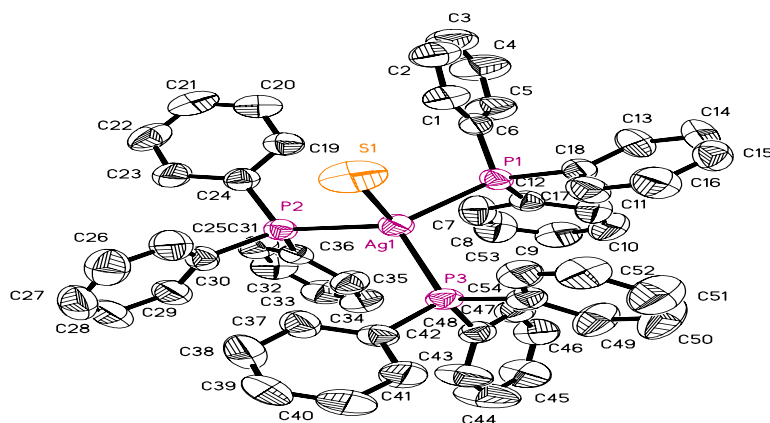
bilik. Didapati, keempat-empat filtrat ini menghasilkan hablur yang sesuai untuk kajian kristalografi sinar-X.

Analisis Kristalografi Sinar-X

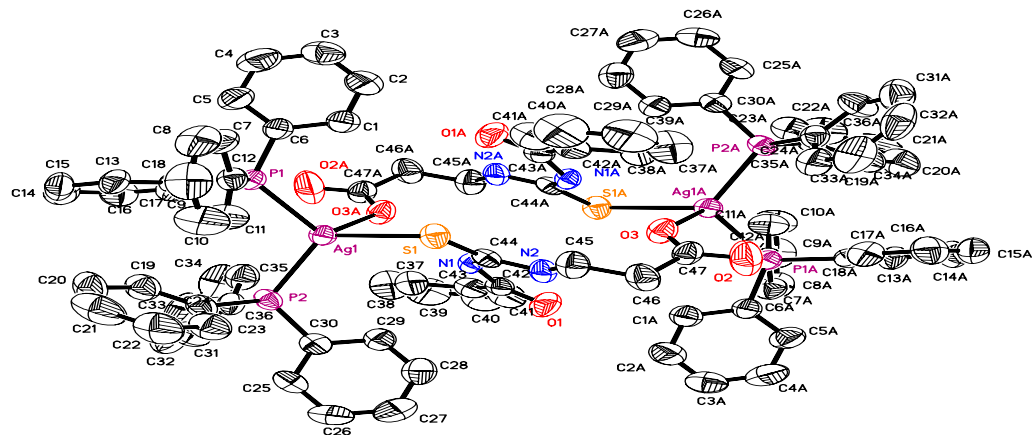
Hablur tunggal yang dipilih dan sesuai dipasang pada SMART APEX CCD Diffractometer. Data pemalangan yang dipungut dan diproses menggunakan perisian SAINT. Perisian SADABS digunakan untuk pembedahan serapan. Penyelesaian struktur dilakukan secara keadah terus (Direct Method) dengan menggunakan perisian program SHELXTL.

3. Hasil dan Pembahasan

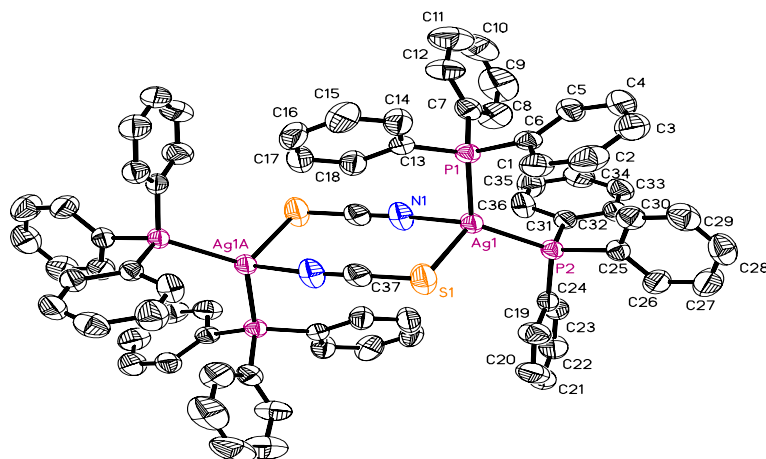
Tindak balas (I) dengan asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik dalam etanol memberikan sedikit mendak hitam dengan serta-merta. Walau bagaimanapun, filtrat larutan tersebut memberikan hablur tanpa warna (hasil 60%) dengan takat lebur 450-451K. hablur tersebut didapati mempunyai sistem triklinik, $P\bar{1}$, $a = 13.346(2) \text{ \AA}$, $b = 13.952(2) \text{ \AA}$, $c = 14.062(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 84.72(3)^\circ$, $\beta = 75.40(3)^\circ$ dan $\gamma = 86.96(3)^\circ$. Rajah 2 menunjukkan struktur molekul produk di mana atom Ag berkoordinat pada atom S dan 3 atom P kumpulan triphenilfosfin yang bersifat monomerik. Geometri atom Ag adalah tetrahedron terherot dengan sudut di sekitar atom Ag antara $101.57^\circ(6) - 116.31^\circ(4)$. Ini merupakan produk Ag-S yang belum dilaporkan. Produk ini isostruktur dengan kompleks $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_3\text{NCS}]\text{CH}_3\text{Cl}$ (Othman et



RAJAH 2 Struktur molekul $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_3\text{S}]$ pada paras kebarangkalian 50% mengikut skema penomboran yang ditunjukkan.



RAJAH 3 Struktur molekul $[C_{47}H_{42}AgN_2O_3P_2S]_2$ pada paras kebarangkalian 50% menggunakan skema penomboran yang ditunjukkan.



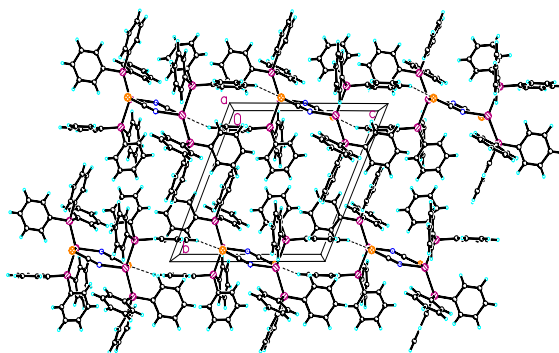
RAJAH 4 Struktur molekul $[C_{37}H_{30}AgN_2P_4S]_2$ pada paras kebarangkalian 50% menggunakan skema penomboran yang ditunjukkan.

al. 1996), $[Ag(PPh_3)_3I]$ (Hibbs et al. 1996), $[Ag(PPh_3)_3X]$ ($X = Cl, Br$ dan I) (Engelhardt et al. 1987) dan $[Ag(O_2NO)(PPh_3)_3]$ (Bruce et al. 1986).

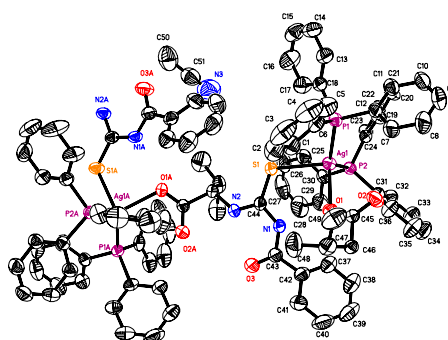
Tindak balas yang sama dalam pelarut kloroform memberikan larutan hitam likat, dan apabila dicairkan dengan sedikit aseton dan etanol memberikan larutan jernih. Filtrat larutan tersebut telah memberikan hablur tanpa warna (hasil 50%; takat lebur 452-453K) mempunyai sistem dan kumpulan ruang yang sama tetapi berbeza dimensi sel unit, $a = 12.6913 \text{ \AA}$, $b = 13.0803 \text{ \AA}$, $c = 14.2673 \text{ \AA}$, $\alpha = 94.888(5)^\circ$, $\beta = 93.818(6)^\circ$ dan $\gamma = 97.254(5)^\circ$. Rajah 3 menunjukkan struktur molekul produk

yang bersifat dimerik dengan formula molekul $[C_{47}H_{42}AgN_2O_3P_2S]_2$. Setiap atom argentum mempunyai geometri tetrahedron terherot dengan sudut sekitar atom ini antara $85.10(14)^\circ$ - $116.67(7)^\circ$.

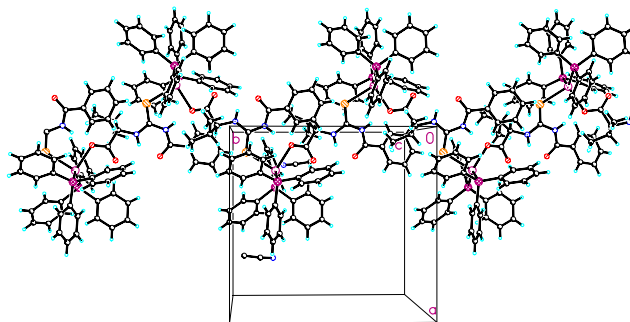
Tindak balas asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik dengan (**I**) telah menghasilkan hablur perang (hasil 30%) dengan takat lebur 510-511K. Analisis sinar-X menunjukkan hablur tersebut mempunyai sistem triklinik dengan kumpulan ruang Pt , $a = 10.310(7) \text{ \AA}$, $b = 13.163(9) \text{ \AA}$, $c = 13.456(9) \text{ \AA}$, $\alpha = 113.165(11)^\circ$, $\beta = 92.023(12)^\circ$ dan $\gamma = 100.556(12)^\circ$. Rajah 4 menunjukkan struktur $[C_{37}H_{30}AgN_2P_4S]_2$ dengan skema penomboran.



RAJAH 4a Gambarajah padatan $[C_{37}H_{30}AgN_2P_4S]_2$ pada paras kebarangkalian 50%



RAJAH 5 Struktur molekul $[C_{49}H_{45}AgN_2O_3P_2S]_n \cdot CH_3CN$ pada paras kebarangkalian 50% menunjukkan skema penomboran yang ditunjukkan



Rajah 5a Gambarajah padatan $[C_{49}H_{45}AgN_2O_3P_2S] \cdot CH_3CN$ pada paras kebarangkalian 50%

Anion NCS^- didapati berketat kepada kedua-dua atom Ag melalui atom S dan N, dan seterusnya membentuk kompleks dimerik. Dalam kekisi hablur, molekul ini distabilkan oleh ikatan hidrogen intermolekul $C3-H3A \cdots S1$ dan membentuk rangkaian satu dimensi selari pada paksi *b* (Rajah 4a). Sudut di sekitar atom-atom argenterum antara $97.13(12)$ - $124.63(6)^\circ$.

Campuran **(I)** dengan asid-2-(3-benzoiltiouredo)-3-metilbutirik yang dikacau dalam pelarut asetonitril menghasilkan sedikit mendak putih. Filtrat jernih campuran bahan tersebut didapati memberikan hablur tanpa warna (hasil 70%; takat lebur 410-411K). Analisis sinar-X mendapati hablur tersebut bersistem ortorombik dengan kumpulan ruang $P2_12_12_1$, $a = 14.665(3)\text{\AA}$, $b = 15.475(3)\text{\AA}$ dan c

= 21.024(4)Å. Rajah 5 menunjukkan struktur produk, $[C_{49}H_{45}AgN_2O_3P_2S]CH_3CN$ dengan skema penomboran. Dalam kompleks ini, atom Ag membentuk aduk melalui ikatan Ag dengan atom S dan O, ligan yang membentuk rantai polimer yang selari dengan paksi *b* (Rajah 5a). Geometri sekitar atom-atom argentum adalah tetrahedron terherot, bersudut antara 90.41(4)^o dan 126.93(2)^o.

4. Kesimpulan

Tindak balas bis[asetatotrifenilfosfinargentum(I)] dengan benzoiltiourea terbitan asid amino tidak menghasilkan produk yang analog tetapi boleh berlainan dan bergantung kepada pelarut. Asid-3-(3-benzoiltiouredo)propionik dalam etanol mengalami pemutusan C=S dan membentuk $[Ag(PPh_3)_3S]$. Sebaliknya dalam kloroform menghasilkan aduk dimer $[C_{47}H_{42}AgN_2O_3P_2S]_2$. Asid-2-(3-benzoiltiouredo)pentanadioik dalam kloroform tidak menghasilkan produk yang analog tetapi $[C_{37}H_{30}AgN_2P_4S]_2$ menunjukkan penglibatan 2 molekul NCS yang bertindak sebagai jejambat menghubungkan 2 atom Ag dalam membentuk dimer. Asid-2-(3-benzoiltiouredo)-3-metilbutirik dalam asetonitril membentuk ikatan Ag-S dan Ag-O antara satu molekul ligan dan 2 atom Ag menjadikan molekul $[C_{49}H_{45}AgN_2O_3P_2S]CH_3CN$ berbentuk rantaian polimer.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan jutaan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi kerana kemudahan yang disediakan dan Kementerian Sains, Teknologi & Inovasi (MOSTI) di atas bantuan kewangan melalui skim Biasiswa National Science Fellowship (NSF).

6. Daftar Pustaka

Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (1992). International Tables for Crystallography, Vol. C, edited by A. J. C. Wilson: 685-706. Dordrecht: Kluwer Academic Publ.

Blues, E. T., Drew, M. G. B. & Onadeko, B. F. (1977).

Tetrakis[acetatotriphenylphosphinesilver(I)]. *Acta Cryst* (B33): 3965-3967

Bruce, M. I. & Duffy, D. N. (1986). Chemistry of the Group IB Metals, XVIII* Crystal and Molecular Structures of Nitrotris(triphenylphosphine)silver(I), $Ag(O_2NO)(PPh_3)_3$. *Aust J. Chem.* (39): 1691-1695

Englhardt, L. M. Healy, P. C., Patrick, V. A. & White, A. H. (1987). Lewis-Base Adducts of Group II Metal(I) compounds. XXX* 3:1 Complexes of Triphenylphosphine with Silver(I) Halides. *Aust J. Chem.* (40): 1873-1880

Hibbs, D. E., Hursthouse, M. B., Malik, K. M. A., Beckett, M. A. & Jone, P. W. (1996). Iodotris(triphenylphosphine)silver(I) $[Ag(PPh_3)_3I]$. *Acta Cryst.* (C52): 884-887

Ng, S. W. & Othman, A. H. (1997). Silver Acetate-Triphenylphosphine Complexes. Acetatobis(triphenylphosphine)silver(I) and its sesquihydrate, and Bis[asetatotriphenylphosphine)silver(I)] Hydrate and its Hemihydrate. *Acta Cryst.* (C53): 1396-1400

Othman, A. H., Fun, H. K., Sivakumar, K. & Baba, I. (1996). (Thiocyanato-*N*) tris(triphenylphosphine)silver(I) Chloroform Solvate. *Acta Cryst.* (C52): 1933-1935.

Othman, A. H., Yang, Y. Y., Chen, X. M. & Ng, S. W. (2000). Trigonal-planar silver coordination in (3,5-dinitrobenzoato)bis(trifenilfosfin)silver(I). *Acta Cryst.* (C56): e318-e319

Sheldrick, G. M. (1996). SADABS. Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, Universiti of Göttingen, Germany.

Sheldrick, G. M. (1997). SHELXTL V5.1 Software Reference Manual, Bruker AXS, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Siemens. (1996). SMART & SAINT. Area Detector Control and Integration Software. Siemens Analytical X-Ray Systems, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Spek, A.L. (1990). PLATON. An Integrated Tool for The Analysis of the Results of a Single Crystals Determination. *Acta Cryst.* (A46): C-34.

Yusuf, M. S. M. & Yamin, B. M. 3-(3-benzoylthiouredo)propionic acid. (2003). *Acta Cryst.* (E59): o828-o829

Metil Linderon, Senyawa Calkon Termodifikasi dari Kayu Batang *Lindera polyantha* (Lauraceae)

Nyoman S. Suastr^{*}, Euis H. Hakim^{*}, Yana M. Syah^{*}, Lia D. Juliawaty^{*}, Sjamsul A. Achmad^{*}, Lukman Makmur^{*}, Zalifah Latif^{**}, Laily bin Din^{**}, Ikram M. Said^{**}

^{*}Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10, Bandung 40132

^{**}School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E, Malaysia

Abstrak

Satu senyawa calkon termodifikasi, metil linderon, telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kayu batang *Lindera polyantha*. Struktur senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR, serta melalui perbandingan dengan senyawa standar.

Kata kunci : *Lindera polyantha*, Lauraceae, metil linderon

1. Pendahuluan

Lindera (Lauraceae) adalah genus yang relatif besar yang memiliki sekitar 100 spesies. Kelompok tumbuhan tersebar luas mulai dari daerah Himalaya, Asia Timur dan Tenggara, sampai Amerika Utara. Di Indonesia genus ini banyak terdapat terutama di pulau Jawa. *Lindera polyantha* Boerl., merupakan pohon dengan tinggi sampai 28 m dan gemang 30-40 cm. Tumbuhan ini tersebar di seluruh pulau Jawa pada ketinggian 400 m di atas permukaan laut. Di Jawa Tengah bagian kayu tumbuhan ini dipakai sebagai kayu bangunan. Tumbuhan ini dikenal dengan sebutan "Huru Beyas" atau "Ki Sapu" (Sunda), Wuru Janggey (Jawa Tengah). (Heyne, 1987).

Pada kesempatan ini akan dilaporkan isolasi satu senyawa calkon termodifikasi, yaitu metil linderon (**1**) dari ekstrak metanol kayu batang *L. polyantha*. Struktur molekul senyawa tersebut disarankan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR, serta perbandingan dengan senyawa standar.

2. Percobaan

Umum. Spektrum UV dan IR masing-masing diukur dengan spektrofotometer Varian Cary 100 Conc UV-Visible dan Spectrum One

Perkin Elmer FTIR. Spektrum ¹H-NMR dan ¹³C-NMR diukur dengan alat spectrometer JEOL AS400 yang beroperasi pada 400 MHz (¹H) dan 100 MHz (¹³C). Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan kromatografi radial dilakukan dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄, sementara kromatografi lapis tipis (KLT) dikerjakan dengan pelat alumunium berlapis silica gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄, 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan adalah yang berkualitas teknis yang didestilasi.

Bahan Tumbuhan. Kayu batang *L. polyantha* diperoleh dari Kebun Raya Cibodas, Bogor, Jawa Barat pada bulan Juli 2004.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kayu batang *L. polyantha* (1,75 kg) diekstraksi dengan metanol pada temperatur kamar sebanyak 3 kali berturut-turut, dan menghasilkan ekstrak metanol (104 g) berupa padatan berwarna coklat gelap. Sebagian dari ekstrak metanol (54,5 g) dipartisikan ke dalam etil asetat, sehingga menghasilkan fraksi etil asetat sebanyak 17,5 g. Fraksi etil asetat tersebut kemudian difraksinasi dengan cara kromatografi cair vakum (KCV) (slika gel) yang dilusi dengan *n*-heksan-etil asetat yang secara berangsur-angsur ditingkatkan

kepolarannya, menghasilkan tiga fraksi utama A (670 mg), B (120 mg), dan C (600 mg). Fraksi A selanjutnya difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi radial (silika gel) yang dilusi dengan *n*-heksan-etil asetat yang berangsur-angsur ditingkatkan kepolarannya) sehingga menghasilkan empat fraksi A1-A4. Pemurnian fraksi A1 (215 mg) dengan kromatografi radial (silika gel) dan dilusi dengan *n*-heksan-etil asetat (9:1) memberikan metil linderon (**1**) (70 mg).

Metil linderon, diperoleh sebagai padatan kristal berwarna kuning muda, t.l. 75-77 °C; UV (MeOH) λ_{maks} : 245 dan 366 nm; IR (KBr) ν_{maks} : 2950, 2840 (C-H alifatik), 1667, 1632 (C=O), 1578, 1448 (cincin aromatik) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): lihat Tabel 1; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): lihat Tabel 1.

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa **1** diperoleh sebagai kristal jarum berwarna kuning muda, t.l. 75-77 °C, Spektrum UV senyawa **1** dalam metanol memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 245 dan 366 nm yang menunjukkan adanya kromofor kalkon. Penambahan pereaksi geser NaOH tidak

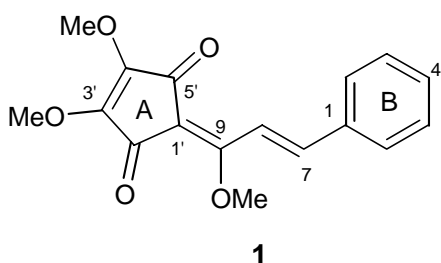
menunjukkan adanya pergeseran batokromik, yang menyarankan tidak ada gugus fenol bebas pada senyawa ini. Spektrum IR senyawa **1** memperlihatkan gugus fungsi utama dari suatu kalkon, dimana gugus $\text{C}=\text{O}$ terkonjugasi muncul pada 1667 dan 1632 cm^{-1} dan vibrasi ulur $\text{C}=\text{C}$ aromatik terlihat pada 1448 dan 1578 cm^{-1} . Selain itu, serapan C-H alifatik tampak di daerah 2840 dan 2950 cm^{-1} . Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1** (Tabel 1) memperlihatkan sejumlah sinyal yang terpisah untuk 17 atom karbon, tiga di antaranya adalah sinyal karbon metoksil (δ_{C} 64,36, 60,01, dan 59,91 ppm). Berdasarkan data spektroskopi tersebut, dapat disarankan bahwa senyawa **1** adalah suatu kalkon termodifikasi dengan kehilangan satu atom karbon. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** (Tabel 1) memperlihatkan adanya dua sinyal *trans*-vinil pada δ_{H} 7,95 dan 7,52 ppm (*d*, $J = 15,8$ Hz) dan sejumlah sinyal dari gugus fenil pada δ_{H} 7,59 (2H, *dd*, $J = 7,6$ dan 1,9 Hz) dan 7,39 ppm (3H, *m*). Sinyal-sinyal proton tersebut adalah sesuai untuk unit sinamoil. Selain itu, spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** juga memperlihatkan tiga sinyal singlet dari tiga gugus metoksil pada δ_{H} 4,11, 4,20, dan 4,21

Tabel 1. Data NMR senyawa **1**

No-C	δ_{H} (<i>multiplisitas</i> , J dalam Hz)		δ_{C}	
	1	1 *	1	1 *
1	-	-	135,6	135,7
2	7,59 (<i>dd</i> , 7,6 & 1,9)	7,60 (<i>dd</i> , 7,6 & 1,9)	128,9	128,9
3	7,39 (<i>m</i>)	7,39 (<i>m</i>)	128,4	128,4
4	7,39 (<i>m</i>)	7,39 (<i>m</i>)	109,5	109,5
5	7,39 (<i>m</i>)	7,39 (<i>m</i>)	128,4	128,4
6	7,59 (<i>dd</i> , 7,6 & 1,9)	7,60 (<i>dd</i> , 7,6 & 1,9)	128,9	128,9
7	7,95 (<i>d</i> , 15,8)	7,95 (<i>d</i> , 15,8)	130,0	130,1
8	7,52 (<i>d</i> , 15,8)	7,52 (<i>d</i> , 15,8)	141,3	141,3
9	-	-	165,5	165,5
1'	-	-	121,2	121,3
2'	-	-	184,8	184,8
3'	-	-	147,8	147,9
4'	-	-	149,0	149,0
5'	-	-	187,3	187,3
3'-OMe	4,18 (<i>s</i>)	4,21 (<i>s</i>)	60,0	60,0
4'-OMe	4,18 (<i>s</i>)	4,20 (<i>s</i>)	59,9	59,9
9-OMe	4,09 (<i>s</i>)	4,11 (<i>s</i>)	64,3	64,4

* Leong, 1998.

ppm. Berdasarkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ maka dapat diperkirakan bahwa cincin B dari calkon tersebut tidak tersubstitusi, sementara cincin A termodifikasi menjadi cincin-C₅ dan tersubstitusi penuh. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1** juga menunjukkan adanya dua sinyal karbon karbonil (δ_{C} 187,3 dan 184,8 ppm), dan selebihnya adalah adanya 12 sinyal C-sp², termasuk tiga sinyal C-oksiril (δ_{C} 147,9, 149,0, dan 165,5 ppm). Data spektrum NMR tersebut ternyata sesuai dengan struktur metil linderon (**1**). Perbandingan data NMR senyawa **1** dengan data yang sama dari metil linderon (Tabel 1) yang diisolasi dari *L. lucida* memperlihatkan kesesuaian yang tinggi pada harga geseran kimianya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa **1** adalah metil linderon.



Metil linderon (**1**) adalah senyawa calkon yang telah mengalami modifikasi pada cincin A sehingga membentuk cincin siklopentenadion. Pembentukan senyawa **1** dapat dijelaskan berasal dari suatu calkon yang tersubstitusi penuh pada cincin A, yaitu 3',4'-dimetoksi-2',5',6'-trihidroksicalkon (**2**). Senyawa **2** pertamakali mengalami oksidasi pada cincin A

menjadi suatu turunan kuinon-calkon (**3**). Turunan kuinon-calkon tersebut kemudian mengalami oksidasi lebih lanjut, sehingga membentuk cincin-C₅ (**4**). Tautomerisasi senyawa **4** yang dilanjutkan metilasi pada C-9 menghasilkan metil linderon (**1**).

4. Kesimpulan

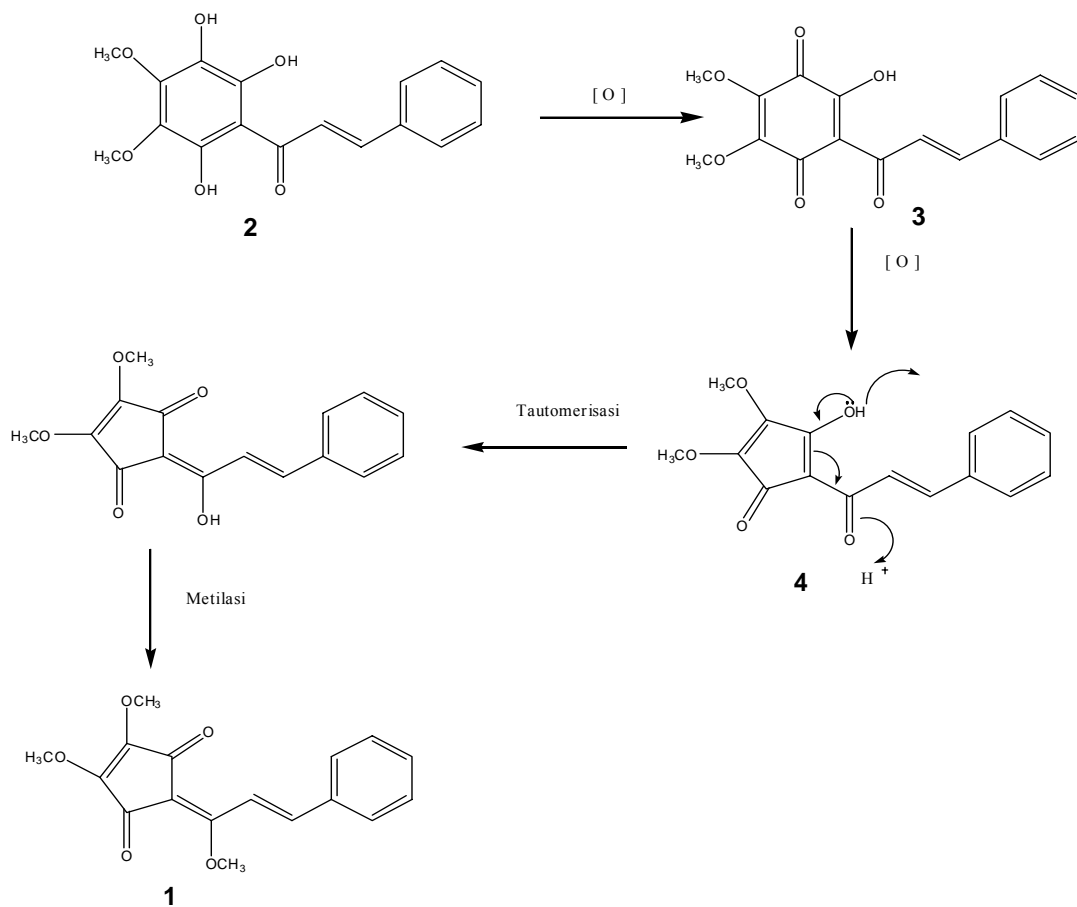
Dari fraksi etil asetat kayu batang *L. polyantha* telah ditemukan senyawa calkon yang termodifikasi yaitu metil linderon (**1**). Dalam makalah ini diusulkan biogenesis pembentukan senyawa **1** dari suatu calkon yang tersubstitusi penuh pada cincin A.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada staf Kebun Raya Cibodas yang telah menyediakan sampel tumbuhan. Penelitian ini juga dibiayai oleh Research Grant dari Proyek Hibah B Batch I, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung.

6. Daftar Pustaka

- Achmad, S.A., "Kimia Organik Bahan Alam", Modul 3-4, Penerbit Karunia, Jakarta, **1986**.
- Heyne K., "*Tumbuhan Berguna Indonesia II*", Badan Litbang Kehutanan, Jakarta. **1987**.
- Lee, S.M., Baek, S.H., Lee, C.H., Lee, H.B., Kho, Y.H., (2002). Cytotoxicity of lignans from *Lindera erytherocarpa* Makino, *Nat. Prod. Sci.*, **8**, 100-102
- Leong, Yuan-Wah, Harrison L.J., Bennet, G.J., Kadir, A.A., Connolly J.D., (1998). A dihydrochalcone from *Lindera lucida*, *Phytochemistry*, **47**, 891-894



Kajian Geokimia Organik Biomarka Hidrokarbon Pada Minyak Mentah Dan Sedimen Formasi Wonocolo

R. Y. Perry Burhan¹⁾

¹⁾Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Kampus ITS Keputih, Surabaya 60111, Indonesia.
E-mail : pburhan@chimie.its.ac.id

Abstrak

Minyak mentah dan sedimen dari formasi Wonocolo, Kawengan telah dikarakterisasi melalui metoda geokimia organik. Minyak mentah diidentifikasi mengandung biomarka *n*-alkana C₁₄-C₃₄ dengan kelimpahan yang tinggi pada homolog di bawah C₂₀, golongan isoprenoida asiklik dengan perbandingan *pristan/fitan* > 1, kelompok hopan yang didominasi oleh isomer 17 α (H), 21 β (H)-hopana. Ekstrak organik sedimen menunjukkan adanya kandungan senyawa *n*-alkana dalam jumlah yang sangat sedikit, isoprenoid asiklik, terpena bisiklik dan golongan hopanoid. Sebaran biomarka ini menggambarkan bahwa bahan organik minyak mentah formasi Wonocolo berasal dari daratan dan mengalami pengendapan dalam lingkungan-purba yang oksidatif. Keberadaan senyawa hopan dengan konfigurasi yang lebih stabil menunjukkan kematangan termal minyak mentah sudah cukup tinggi.

Kata kunci : *n*-alkana, biomarka, formasi Wonocolo, hopana

1. Pendahuluan

Sekitar tahun 1960-an merupakan era awal eksplorasi minyak bumi yang difungsikan sebagai sumber energi utama bagi manusia. Tuntutan perkembangan pengetahuan tentang minyak bumi sangat diperlukan seiring dengan banyak ditemukan sumur-sumur minyak baru. Perusahaan-perusahaan eksplorasi minyak bumi memerlukan pengetahuan kajian baru untuk memahami mekanisme pembentukan dan penumpukan minyak bumi dalam sumur-sumur minyak. Geokimia organik merupakan salah satu ilmu kebumihian untuk membantu eksplorasi minyak bumi yang menerangkan tentang asal usul dan waktu pematangan minyak bumi. (Durand, 2003; Peters dan Moldowan, 1993; Demaison, 1984).

Aplikasi geokimia organik terhadap minyak bumi dan sedimen dilakukan berdasarkan pengkajian atas senyawa-senyawa organik yang sudah menjadi fosil, dikenal dengan fosil molekul organik (biomarka). Profil biomarka dapat memberikan informasi tentang komposisi, asal-usul, mekanisme pembentukan, cara pengendapan dan distribusi bahan-bahan

organik temperatur pematangan dan/atau biodegradasi, karakter sumber bahan organik dalam minyak dan batuan, karakteristik lingkungan pengendapan, dan pada akhirnya digunakan untuk mengerti perubahan kinetik minyak dan asal usul temperatur basin. (Petersen, *et al.*, 2004; Tiercelin, *et al.*, 2004; Pang, *et al.*, 2003; Peters dan Fowler, 2003; Nishigima, *et al.*, 2001; Duan, 2000; de Leew, *et al.*, 1995; Peters dan Moldowan, 1993; Tissot dan Walte, 1984;).

Sedimen Formasi Wonocolo mempunyai struktur geologi berupa napal dengan sisipan kalkarenit pada bagian atas dan batu lempung pada bagian bawah. Kalkarenit berwarna putih kekuningan dan putih kelabu, berbutir sedang sampai halus, tersusun oleh butiran karbonat, kuarsa, sedikit glaukonit, dan mineral hitam, tebal lapisan antara 5-20 cm. Sedangkan batu lempung berwarna kelabu hingga kelabu tua, mengandung kuarsa, bersifat lunak dan rapuh. Sifat pasiran dan adanya sedikit glaukonit merupakan ciri utama dari formasi ini. Formasi Wonocolo ini mengandung fosil, diantaranya *Globigerina nephentes*, *Globorotalia miocenia*,

Orbulina suturalis, *Sphaeroidinellopsis subdeiscens*, *Hastigerina aeguilateralis*. Himpunan fosil tersebut menunjukkan bahwa sedimen Formasi Wonocolo tersebut berumur Miosen Atas ($\pm 22,5$ juta tahun). Lingkungan pengendapannya sublitoral hingga batial atas, pada kedalaman antara 500-200 m (Pringgoprawiro dan Sukido, 1992).

Pengenalan suatu sedimen dan minyak mentah dapat dilakukan dengan mengetahui komponen-komponen penyusunnya. Biomarka dari sedimen Formasi Wonocolo belum pernah dilaporkan profilnya. Sebagai salah satu variabel dalam geokimia organik yang dapat menunjang kegiatan eksplorasi, merupakan suatu tantangan yang menarik untuk mengungkapkan profil biomarkanya. Pada makalah ini akan diuraikan kajian geokimia organik minyak mentah dan sedimen yang berada pada formasi Wonocolo. Pengungkapan profil ini akan dapat menyingkap rahasia lingkungan purba, asal-usul, serta kaitannya dengan keberadaan minyak bumi.

2. Percobaan

Sampel dan bahan kimia. Contoh berupa sedimen dan minyak mentah diambil dari Formasi Wonocolo yang berlokasi di Lapangan Kawangan sebelah utara Cepu, Jawa Tengah. Bahan kimia berupa pelarut dan pereaksi, *analytical grade* diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman) yang diperlakukan khusus untuk pembebasan kontaminan hidrokarbon.

Ekstraksi sedimen dan minyak mentah. Sedimen (200 g) digiling halus, diekstraksi pada suhu 60 °C dengan aseton diikuti dengan campuran diklorometana/metanol (3:1) Semua ekstrak organik digabung, dan ekstrak disebut ekstrak organik total (EOT) bahan sedimen. Minyak mentah sampel diendapkan aspaltenya penambahan *n*-pentana, lalu dibiarkan selama 24 jam, pisahkan endapannya, dan cairannya dapat dipakai untuk perlakuan selanjutnya.

Fraksinasi sedimen dan minyak mentah. Minyak mentah sampel bebas aspalten maupun ekstrak organik total masing-masing diaplikasikan ke dalam kromatografi kolom silika gel jenuh KOH (sesuai prosedur McCarthy dan Duthie, 1962). Fraksi netral dipisahkan dengan menggunakan eluen dietil eter. Selanjutnya pemisahan fraksi non polar dari fraksi netral dilakukan menggunakan

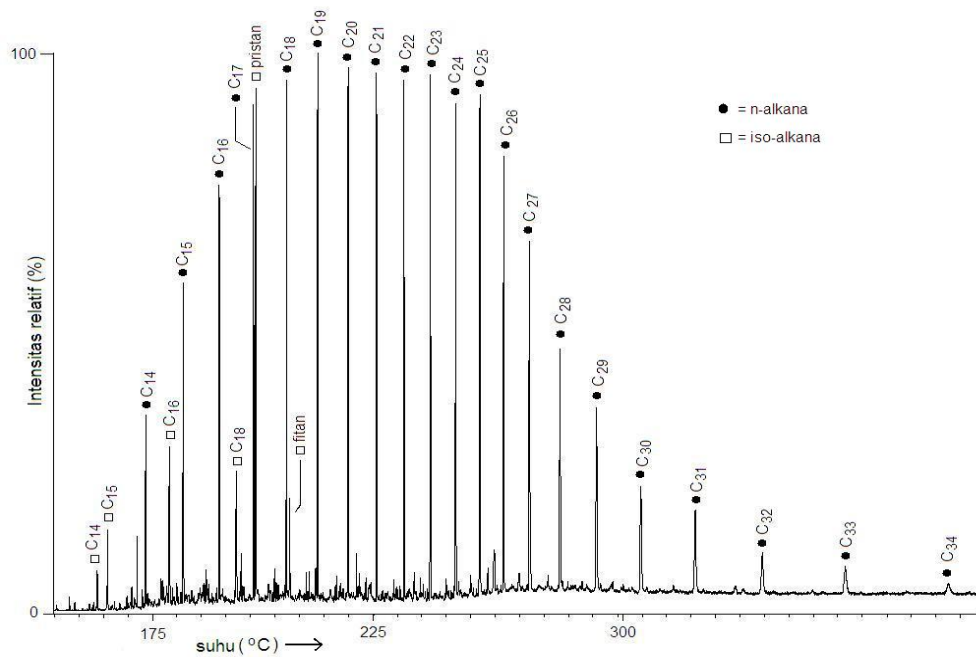
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan eluen diklorometana. Fraksi non polar yang didapatkan, direfraksinasi menjadi fraksi hidrokarbon alifatik dan fraksi aromatik dengan menggunakan KLT dan pelarut *n*-heksana dan dengan bantuan pembanding DBA dan lupena. Fraksi hidrokarbon alifatik yang berada pada daerah R_f 0,74–1,00 diperoleh kembali dari pelat lapis tipis silika.

Analisa Kromatografi Gas – Spektrometri Massa (KG-SM). Analisa biomarka hidrokarbon alifatik menggunakan KG-SM dilakukan dengan peralatan Hewlett-Packard model 6890 GC yang tergabung dengan Hewlett-Packard 5973 MSD dan dilengkapi dengan sistem komputer data. Analisa KG-SM dilakukan dengan menggunakan kolom HP-5MS (Hewlett-Packard) berukuran 50m x 200 μ m x 0,33 μ m. Program temperatur kromatografi gas adalah 50 °C (3 mnt), 50-100 °C (10 °C/mnt), 100-300 °C (4 °C/mnt) dan isothermal pada 300 °C. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium. Sampel diinjeksikan “splitless” ke injektor pada suhu 300 °C. Kondisi operasi SM menggunakan sistem dampak elektron pada energi elektron 70 eV melalui scanning dari 40 – 540 amu. Data diakuisisi dan diproses dengan perangkat lunak Chemstation.

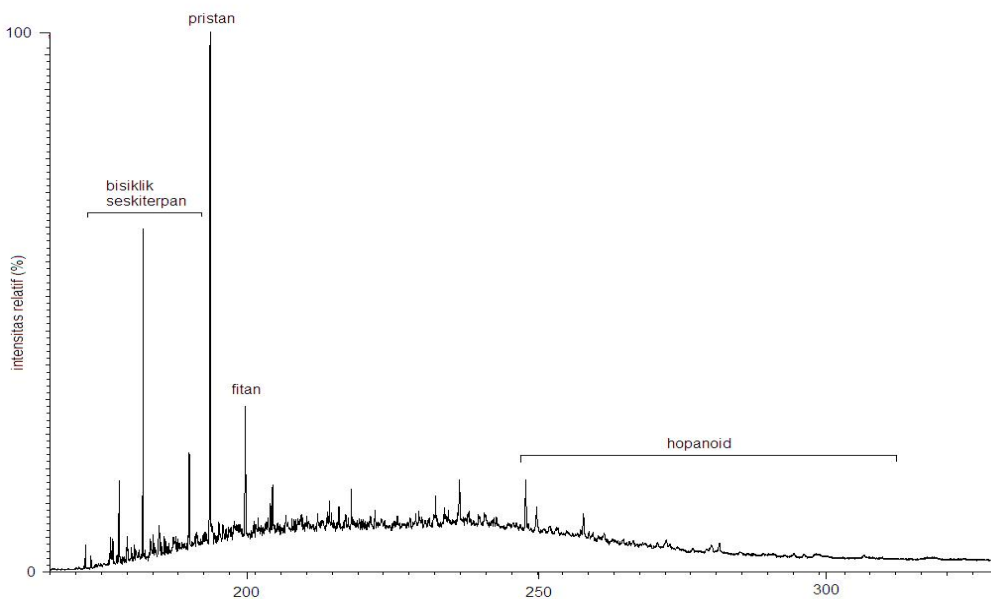
3. Hasil dan Pembahasan

n-Alkana dan hidrokarbon isoprenoida

Komposisi fraksi hidrokarbon alifatik dari contoh minyak mentah yang diambil dari Formasi Wonocolo ditunjukkan dengan kromatogram pada Gambar 1. Senyawa *n*-alkana yang teridentifikasi dari minyak mentah ini adalah homolog *n*-alkana pada rentang antar $C_{14} - C_{34}$ dan isoprenoida asiklik yang terdeteksi adalah pada rentang *i*- $C_{14} - i$ - C_{19} . Homolog *n*-alkana $C_{14} - C_{34}$ mempunyai distribusi unimodal dengan kelimpahan tertinggi berada pada *n*- C_{19} dan dominasi kelimpahan berada pada rantai pendek. Kelimpahan rantai pendek ini kemungkinan diturunkan dari alga dan bakteri disebabkan oleh terjadinya pemutusan *n*-alkana berantai panjang selama proses pemendaman karena pengaruh termal dan atau aktivitas mikrobial (Han dan Calvin, 1969). *n*-Alkana berantai panjang ($> C_{19}$) menunjukkan bahwa bahan-bahan organik berasal dari tumbuhan daratan tingkat tinggi dan sedikit kontribusi dari



Gambar 1. Kromatogram gas fraksi hidrokarbon alifatik dari minyak mentah formasi Wonocolo.

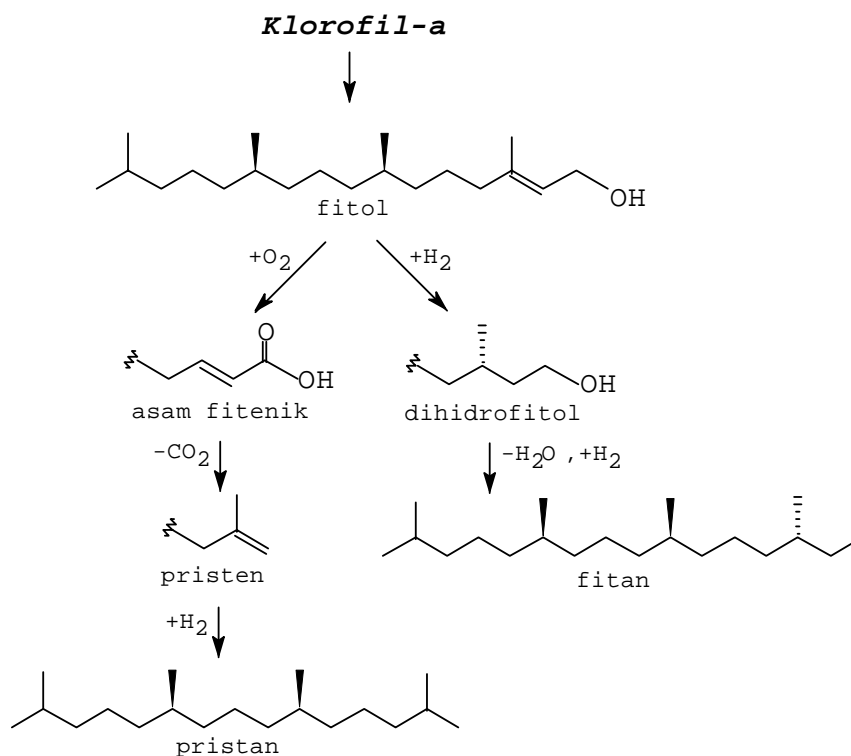


Gambar 2. Kromatogram gas fraksi hidrokarbon alifatik dari sedimen formasi Wonocolo.

mikrobal dan alga ($< C_{19}$) (Volkman, *et al.*, 1983).

Pada kromatogram contoh sedimen formasi Wonocolo (Gambar 2) tidak dijumpai senyawa-senyawa *n*-alkana dan isoprenoida asiklik dalam kelimpahan yang berarti, disebabkan konsentrasinya yang rendah. Biomarka yang mendominasi pada contoh sedimen adalah

isoprenoid pristan dan fitan. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa hidrokarbon pada sedimen di Formasi Wonocolo dimungkinkan mengalami biodegradasi. Tingkat biodegradasi berturut-turut ditunjukkan dengan hilangnya biomarka *n*-alkana, isoprenoida asiklik, hilangnya senyawa hopana, steran, kemudian senyawa-senyawa golongan aromatik (Moldowan, *et al.*, 1995).

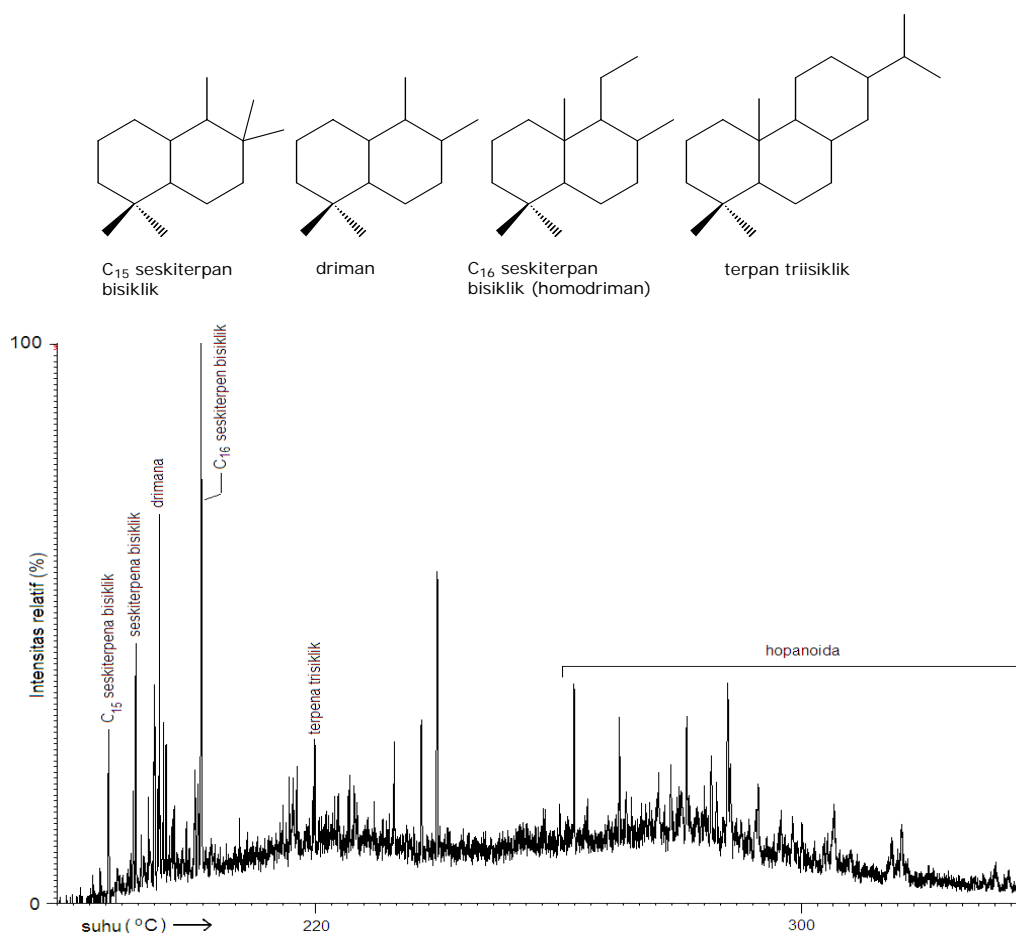


Gambar 3. Pembentukan senyawa pristan dan fitan dari fitol selama pемendamаn.

Senyawa-senyawa isoprenoіda asiklik yang ditemukan pada contoh minyak mentah adalah *i*-C₁₄ – *i*-C₂₀ dengan dominasi keberadaan senyawa pristan (2,6,10,14-tetrametilpentadekana) dan fitan (2,6,10,14-tetrametilheksadekana (Gambar 1. dan 2.), sedangkan pada contoh sedimen isoprenoіda asiklik yang signifikan hanya pristan dan fitan saja. Perbandingan pristan dan fitan (pristan/fitan) pada minyak dan sedimen di Formasi Wonocolo masing-masing sebesar 4,47 dan 3,25. Senyawa-senyawa isoprenoіda asiklik pada umumnya merupakan turunan dari rantai samping fitil pada klorofil-a (Gambar 3). dalam organisme fototropik, meskipun ada yang berasal dari sumber lain seperti arkaebakteri. Pada kondisi anoksik dalam sedimen, senyawa fitol tereduksi menjadi dihidrofitol, reduksi tersebut berlanjut dan akhirnya membentuk senyawa fitan. Sedangkan pada kondisi oksidatif, fitol teroksidasi menjadi asam fitenik, kemudian asam fitenik mengalami dekarboksilasi menjadi pristen lalu tereduksi membentuk pristan. Melihat jalur penurunan pristan dan fitan dari senyawa fitol, perbandingan pristan dan fitan (pristan/fitan) dapat memberikan informasi mengenai

lingkungan pengendapan suatu minyak dan sedimen. Besarnya perbandingan pristan/fitan tersebut menggambarkan kondisi lingkungan pengendapan pada formasi Wonocolo adalah bersifat oksidatif (Dydik, *et al.*, 1978).

Informasi lain yang dapat diperoleh dari biomarka *n*-alkana adalah kematangan termal suatu minyak, yaitu dengan perbandingan rata-rata kelimpahan *n*-alkana dengan jumlah atom karbon ganjil dan karbon genap yang disebut Indeks Preferensi Karbon (IPK). Besarnya nilai IPK contoh minyak mentah formasi Wonocolo adalah 1,04. Angka perbandingan 1,04 tersebut menunjukkan bahwa minyak dalam keadaan cukup matang, dan nilai IPK meningkat dengan bertambahnya kedalaman. Minyak bumi biasanya mengandung *n*-alkana dengan jumlah atom karbon ganjil yang dominan sehingga perbandingan jumlah atom karbon ganjil/genap lebih dari 1. Hidrokarbon rantai panjang *n*-C₂₅, *n*-C₂₇, *n*-C₂₉ dan *n*-C₃₁ diprediksi diturunkan dari tumbuhan daratan. Peningkatan nilai IPK dengan bertambahnya kedalaman menggambarkan menurunnya kontribusi hidrokarbon antropogenik dan kontribusi hidrokarbon biogenik yang konstan selama



Gambar 4. Fragmentogram m/z 123 fraksi hidrokarbon alifatik dari sedimen formasi Wonocolo.

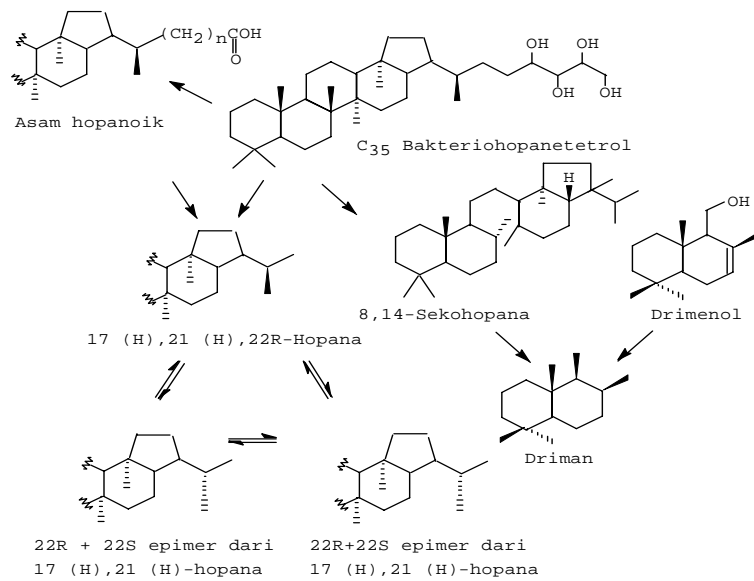
periode waktu tertentu (Duan, 2000; Nikolaeva *et al.*, 1999; Wade dan Quinn, 1978)

Tingkat biodegradasi yang dialami oleh minyak mentah dapat dihitung dengan perbandingan senyawa isoprenoida asiklik, yaitu kandungan pristan dan fitan dengan n -alkana C_{17} dan C_{18} $\{(\text{pristan} + \text{fitan}) / (C_{17} + C_{18})\}$. Nilai perbandingan pristan dan fitan dengan C_{17} dan C_{18} pada contoh sedimen formasi Wonocolo sebesar 0,6 yang menunjukkan bahwa minyak tidak mengalami degradasi. Perbandingan tersebut menunjukkan bahwa kemampuan mikroorganisme yang lebih mudah mendegradasi senyawa-senyawa n -alkana daripada senyawa-senyawa isoprenoida asiklik, sehingga nilai tersebut cukup jauh jika dibandingkan dengan yang telah dilaporkan pada contoh minyak di Sovetskoe dan Samotlor sebesar 1,18 dan 1,21 (Svarouskaya dan Altunia, 1999).

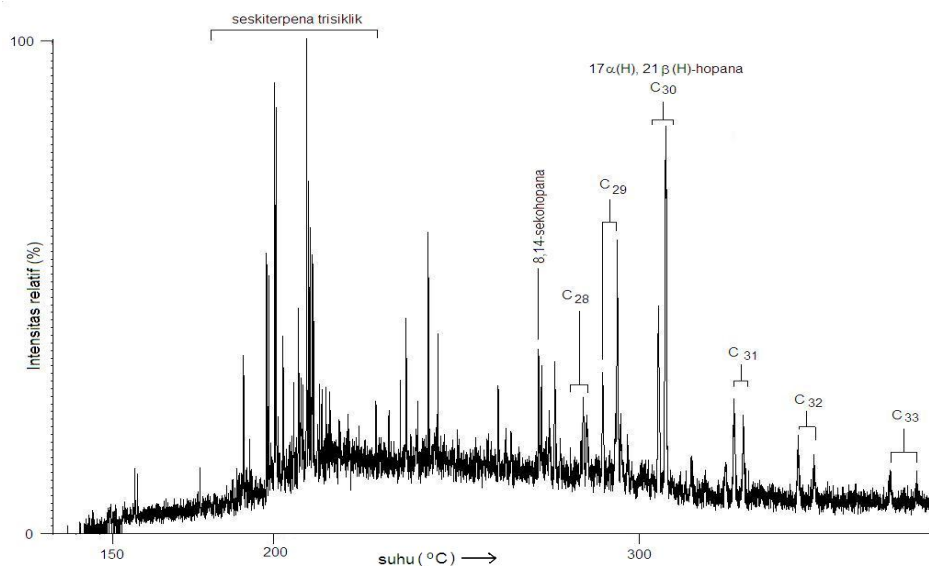
Terpenoid Polisiklik

Senyawa-senyawa hidrokarbon polisiklik yang ditemukan dalam contoh sedimen Formasi Wonocolo adalah terpen bisiklik, trisiklik, tetrasiklik dan pentasiklik. Terpen bisklik dan trisiklik diidentifikasi dengan fragmentogram m/z 123 (Gambar 4), yaitu berupa senyawa-senyawa C_{15} seskiterpena bisiklik, drimana, C_{16} seskiterpena bisiklik (homodrimana), serta trisiklik terpena.

Biomarka bisiklik seskiterpen C_{15} dan C_{16} dihasilkan dari siklisasi terpena, seperti geraniogeraniol yang diusulkan sebagai prekursor utama dari kelas diterpena C_{20} yang ditemukan pada tumbuhan daratan tingkat tinggi. Senyawa tersebut mengalami perubahan menjadi asam bisiklik terpenoida dan alkohol, kemudian selama proses diagenesis akan mengalami dehidrasi dan reduksi bisiklik terpena sebagai biomarka (Alexander, *et al.*, 1983). Sumber lain yang mungkin dari senyawa-senyawa hidrokarbon bisiklik berasal



Gambar 5. Penurunan senyawa hopana, sekohopana dan driman dari bakteriohopanetetrol



Gambar 6. Fragmentogram m/z 191 fraksi hidrokarbon alifatik dari sedimen formasi Wonocolo.

dari termal alterasi senyawa terpena berbobot molekul tinggi seperti squalena akibat proses enzimatis. Pada Gambar 5 senyawa driman pada mempunyai dua kemungkinan asal sumber, yaitu berasal dari fragmen cincin A,B sekohopana, kemungkinan lain berasal dari reduksi drimenol yang juga berasal dari mikrobial. Senyawa trisiklik terpenoid kemungkinan diturunkan dari asam abietat atau asam pimaric. Asam abietat dan asam pimaric dibentuk dari siklisasi geranylgeraniol pada tanaman tingkat tinggi (Richardson dan Miller, 1982).

Senyawa terpenoid pentasiklik yang diidentifikasi adalah hopana reguler C₂₉-C₃₃ C₃₀ dengan stereokimia 17 α (H),21 β (H)-hopana dan 8,14-sekohopana ditunjukkan pada fragmentogram m/z 191 (Gambar 6) Keberadaan senyawa-senyawa tersebut dapat dirangkaikan menjadi jalur penurunan biomarker polisiklik hidrokarbon dari senyawa C₃₅ bakteriohopanetetrol (Gambar 5).

Senyawa bakteriohopanetetrol terdapat pada membran bakteri prokariotik yang diduga disintesa melalui siklisasi dari skualen. Selama

proses sedimentasi senyawa bakteriohopanetetrol mengalami proses geologi menghasilkan asam hopanoid dan hidrokarbon. Kerangka biohopanoid dengan konfigurasi 17 β H,21 β H berubah menjadi konfigurasi yang lebih stabil 17 α H,21 β H dan 17 β H,21 α H akibat pemanasan dan pembedaman selama diagenesis. Stereokimia senyawa hopanoid dapat memberikan informasi kematangan suatu sedimen. Senyawa hopanoid yang ditemukan pada contoh sedimen Formasi Wonocolo mempunyai konfigurasi paling stabil, yaitu 17 α H,21 β H, menandakan bahwa sedimen tersebut mengalami proses diagenesis dan telah cukup matang. Keberadaan senyawa hopanoid juga menggambarkan aktifitas mikroorganisme yang tinggi pada sedimen (Kautt dan Albrecht, 1989).

4. Kesimpulan

Distribusi *n*-alkana C₁₄-C₃₄ pada minyak mempunyai kelimpahan yang tinggi terhadap hidrokarbon yang mempunyai C di bawah 20. Keberadaan senyawa-senyawa bisiklik terpenoida yang diturunkan dari kelas diterpena C₂₀ serta trisiklik terpena yang diduga berasal dari asam abietat dan pimarit menunjukkan bahwa bahan-bahan organik pada sedimen dan minyak berasal dari daratan.

Perbandingan pristan dan fitan pada sedimen dan minyak sebesar 3,25 dan 4,47 menunjukkan lingkungan pengendapan yang bersifat oksidatif. Konfigurasi yang stabil dari senyawa hopana 17 α (H),21 β (H) pada sedimen menandakan bahwa sedimen tersebut mengalami proses diagenesis dan telah cukup matang. Keberadaan senyawa hopanoida juga menggambarkan aktifitas mikroorganisme yang tinggi pada sedimen. Perbedaan yang signifikan dapat diperkirakan bahwa tidak ada korelasi antara sedimen dan minyak bumi di Formasi Wonocolo.

5. Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Pita Kumudasari, Ibu Ir. Nina Agustiana dan Bimo H. Progo atas bantuan analisa spektrum massa.

6. Daftar Pustaka

Alexander, R., Kagi, R., dan Noble, R., (1983), Identification of the Bicyclic Sesquiterpenes, Drimane, and Eudesman in Petroleum, *JCS., Chem. Comm.*, 226-228.

Demaison, G. J., (1984), The Generative basin concept. In: Petroleum Geochemistry and Basin Evaluation, *American Association of Petroleum Geologists Memoir*, 35, 1-14

Duan, Y., (2000), Organic geochemistry of recent marine sediments from the Nansha Sea, China, *Org. Geochem.*, 31, 159-167.

Durand, B., (2003), A History of Organic Geochemistry, *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, 58(2), 203-231

Didyk, B. M., Simoneit, B. R. T., Brassell, S. C. Eglinton, G., (1978), Organic geochemical indicators of palaeoenvironment conditions of sedimentation, *Nature*, 272, 216-222.

Han, J., Calvin, M., (1969), Hydrocarbon distribution of algae and bacteria, and microbial activity in sediments, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 64, 1436-443.

de Leeuw, J. W., Frewin, N. L., van Bergen, P. F., Sinninghe Damsté, J. S., Collinson, M. E., (1995), Organic carbon as a palaeoenvironmental indicator in the marine realm. In: *Marine Palaeoenvironmental Analysis from Fossils*, Bosence, D. W. J., & Allison, P. A (Eds), Geological Society Special Publication No. 83, pp. 43-71.

McCarthy, R. D., Duthie, A.H., (1962), A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids, *J. Lipid Res.*, 3(1), 117-119.

Moldowan, J. M., Dahl, J., McCaffrey, M. A., (1995), Applications of Biological Marker Technology to Bioremediation of Refinery by Products, *Energy and Fuels*, 9, 155-162.

Nikolaeva, T. L., Filippova, T. Y., Serebrennikova, O. V., Min, R. S., Mozzhelina, (1999), Composition Features of Heteroorganic Compounds and Hydrocarbons from Paleozoic Oils Southeast of the West Siberian Plate, *Petroleum Chemistry*, 39(1), 28-32.

Nishigima, F. N., Weber, R. R., Bicego, M. C., (2001), Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil, *Mar. Poll. Bull.*, 42(11), 1064-1072.

Pang, X., Li, M., Li, S., Jin, Z., Xu, Z., Chen, A., (2003), Origin of crude oils in the Jinhu Depression of North Jiangsu-South Yellow Sea Basin, eastern China, *Org. Geochem.*, 34, 553-573.

Peters, K. E., Moldowan, J. M., (1993), *The Biomarkers Guide Interpreting Molecular Fossil in Petroleum and Ancient Sediment*, Prentice Hall. Inc., New Jersey.

Peters, K. E., Fowler, M. G., (2002), Review: Applications of petroleum geochemistry to

R. Y. Perry Burhan

- exploration and reservoir management, *Org. Geochem.*, **33**, 5-36.
- Petersen, H. I., Nytoft, H. P., Nielsen, L. H., (2004), Characterisation of oil and potential source rocks in the northeastern Song Hon Basin, Vietnam: indications of a lacustrine-coal sourced petroleum system, *Org. Geochem.*, **35**, 493-515.
- Pringgoprawiro, H., Sukido, (1992), *Geologi Lembar Bojonegoro, Jawa*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi, Bandung.
- Richardson, J. S., Miller, D. E., (1982), Identification of Dicyclic dan Tricyclic Hydrocarbon in the Saturate Fraction of a Crude Oil by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **54**(4), 765-768.
- Ries-Kautt, M., Albrecht, P., (1989), Hopane-Derived Triterpenoids in Soil, *Chem. Geol.*, **76**, 143-151.
- Svarouskaya, L. I., Altunia, L. K., (1999), Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Formation Microflora, *Petroleum Chemistry*, **39**(2), 128-131.
- Tiercelin, J.-J., Potdevin, J.-L., Morley, C. K., Talbot, M. R., Bellon, H., Rio, A., Le Gall, B., Vétel, W., (2004), Hydrocarbon potential of the Meso-Cenozoic Turkana Depression, northern Kenya. I. Reservoirs: depositional environments, diagenetic characteristics, and source rock-reservoir relationships, *Marine and Petroleum Geol.*, **21**, 41-62.
- Tissot, B., Welte, D., (1984), *Petroleum Formation and Occurrence*, 2nd ed., Springer-Verlag, Heidelberg
- Volkman, J. K., Farrington, J. W., Gagosian, R. B., Wakeham, S. G. (1983), Lipid composition of coastal marine sediments from the Peru upwelling region. In: *Advances in Organic Geochemistry 1981*, Bjorøy, M. *et al.*, (Eds.), Wiley, New York, pp. 228-240.
- Wade, T. L., Quinn, J. G., (1978), Geochemical Distribution of Hydrocarbons in Sediments from Mid-Narragansett Bay, Rhode Island, *Org. Geochem.*, **1**, 157-167.

Corrosion Inhibition Of Carbon Steel In Sodium Chloride Solution By Benzotriazole-Effects Of Immersion Time And Temperature

P. Yatiman ¹⁾, N. M. Surdia ²⁾, S. Purwadaria ³⁾, B. Ariwahjoedi ²⁾ and R. Suratman ⁴⁾

1). FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta
Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Indonesia
e-mail: pyatiman@lycos.com

2). Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung,, 40132, Indonesia
e-mail: ari@chem.itb.ac.id

3). Departemen Teknik Pertambangan Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: sunara_p@yahoo.com

4). Departemen Teknik Mesin Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: r_suratman@lycos.com

Abstract

Benzotriazole (BTAH) was investigated as a corrosion inhibitor for Type API 5L X65 carbon steel in sodium chloride (NaCl) solution in the presence of carbon dioxide (CO₂). The effect of immersion time and temperature were studied. These tests were conducted in 1% NaCl (pH 7.02) in the presence of CO₂ with and without 1000 ppm BTAH at various immersion times and temperatures of 25, 45, 65 and 85°C using electrochemical impedance spectroscopic technique. The observed inhibition efficiency was found to depend on the immersion time and temperature. The longer the immersion time of carbon steel in 1% NaCl containing CO₂ and BTAH the higher is the inhibition efficiency. In general, the inhibition efficiency decreased as the temperature increased, although inhibition efficiencies at 85°C after immersion time of 25 and 30 hours are higher than those at 65°C after the same immersion times due to the decrease in FeCO₃ and CO₂ solubility.

Key words: Benzotriazole, corrosion inhibition, immersion time, temperature and Type API 5L X65 carbon steel.

1. Introduction

The application of corrosion inhibitors in the industry is widely used to prevent or minimize metal loss during contact with media. There is a continuous search for better corrosion inhibitors to meet the needs of industry due to the vast differences of the media encountered in the industry. Corrosion inhibition of metals by organic compounds is caused by adsorption of molecules and ions on the metal surface. Most of the efficient inhibitors used in industry are organic compounds containing mainly oxygen, sulfur, nitrogen atoms and multiple bonds in the molecules that facilitate adsorption on the metal surface (Quraishi and Sardar, 2002). The corrosion inhibition efficiency of organic

compounds is related to their adsorption properties. It has been known that adsorption mainly depends on the presence of π -electrons and heteroatoms, which induce greater adsorption of the inhibitor molecules onto the surface of metal.

Benzotriazole (C₆H₅N₃) is the organic compound containing nitrogen atoms and double bonds as adsorption centers, which facilitate adsorption on the metal surface. Benzotriazole (BTAH) has been reported as one of the efficient inhibitors for copper (Bastidas, *et.al.*, 2002; Matos, *et.al.*, 2001; Frignani, *et.al.*, 1999), copper alloys (Walker, 2000; Babic, *et.al.*, 1999; Jinturkar, *et.al.*, 1998) and iron (Eldakar and Nobe, 1981,

1977). Most of the studies in using BTAH as corrosion inhibitor for copper and its alloys were carried out in the acidic media at room temperature. Whereas, the studies of corrosion inhibitor for iron using BTAH were focused on the effect of BTAH on the anodic and cathodic dissolution in acid solution at room temperature.

In the present work, the effects of immersion time and temperature on corrosion inhibition of Type API 5L X65 carbon steel in sodium chloride solution (pH 7.02) with and without BTAH in the presence of carbon dioxide were investigated. This study was conducted using electrochemical impedance spectroscopic (EIS) technique to determine the inhibition efficiency of BTAH for the Type API 5L X65 carbon steel corrosion in sodium chloride solution at various immersion times and temperatures.

2. Experimental

a. The working electrode was Type API 5L X65 carbon steel with 0.78 cm² surface area and the composition 0.0533% C, 0.2374% Si, 1.153% Mn, 0.0282% P, 0.0292% Cr, 0.1733% Mo, 0.0465% Ni, 0.0865% Cu, 0.0022% V, and bal. Fe. Specimens were polished with a 1200-grade silicon carbide (SiC) paper, degreased with acetone (CH₃COCH₃) and air dried before immersion into the test electrolyte. The total volume of solution was 1200 mL.

b. All solutions were prepared from analytical reagent (AR)-grade NaCl (Merck[®]) with and without BTAH (Merck[®]) using aquabidest.

c. The impedance experiments were conducted using a Radiometer[®] potentiostat/galvanostat with software VoltaLab[®] 40. All experiments were carried out using a three-cell electrode with saturated calomel electrode (SCE), a Pt electrode and Type API 5L X65 carbon steel as reference, auxiliary and working electrodes, respectively. The test electrolyte was 1% NaCl solution (pH 7.02) with and without 1000 ppm BTAH in the presence of CO₂. The pressure of CO₂ was 6 mbar.

d. All impedance measurements were performed at the open circuit (corrosion) potential. The frequency range was 100 kHz to 100 mHz. All experiments were conducted at immersion times 0, 0.167, 1, 5, 25 and 30 h, and temperatures 25, 45, 65 and 85°C.

e. Inhibition efficiency was calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition efficiency (IE)} = \frac{R_p - R_{p(0)}}{R_p} \times 100\% \quad (1)$$

where $R_{p(0)}$ and R_p are the polarization resistance in the absence and presence of BTAH, respectively.

3. Results and Discussion

The effect of immersion time on the inhibition of 1000 ppm BTAH on the corrosion of Type API 5L X65 in 1% NaCl in the presence of CO₂ at various temperatures was studied using EIS measurements. Figures 1 to 4 show the Nyquist curves obtained after immersion times 0 h (in the absence of BTAH), 0.167, 1, 5, 25 and 30 h (in the presence of BTAH) at temperatures 25, 45, 65 and 85°C, respectively. It can be seen that the polarization resistance (R_p) increases with the immersion time. The longer the immersion time the higher is the polarization resistance. From equation (1), because the polarization resistance increases so the inhibition efficiency (I E) also increases with the immersion time. Figure 5 shows the inhibition efficiency of BTAH on the corrosion of carbon steel in NaCl solution as a function of immersion time.

The increase in inhibition efficiency with longer immersion time in NaCl solution containing BTAH can be explained by the growth of a protective film on the surface of the carbon steel, which is time dependent. BTAH is a triazole compound possessing an abundance of π -electrons and unshared electron pairs on the nitrogen atoms, which can interact with d orbitals of iron to provide a protective film (Bentiss, *et.al.*, 2002) on the surface of carbon steel. In addition, the large magnitude of the impedance at low frequencies indicates that the film is protective (Agarwal, *et.al.*, 1993). At the low frequency, the longer the immersion time the larger is the magnitude of the impedance.

The effect of temperature on the inhibition of 1000 ppm BTAH on the corrosion of type API 5L X65 in 1% NaCl in the presence of CO₂ at various immersion times was studied using EIS measurements. Figures 1 to 4 show the Nyquist curves obtained at temperature 25, 45, 65 and 85°C after immersion times 0 h (in the absence of BTAH), 0.167, 1, 5, 25 and 30 h (in the presence of BTAH), respectively. In general,

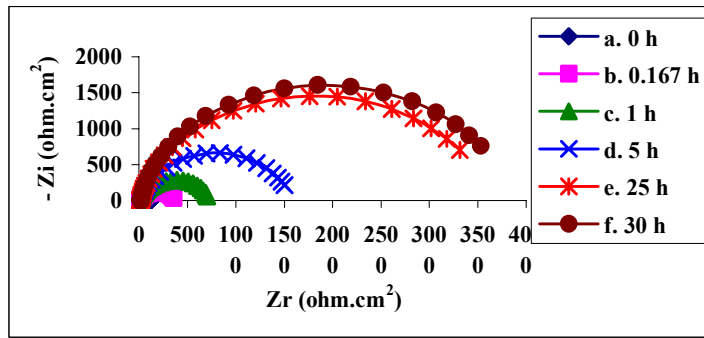


Figure 1. Nyquist plot of Type API 5L X65 carbon steel in 1% NaCl in the presence of 1000 ppm BTAH and CO₂ at 25°C after immersion times (a). 0 h, (b). 0.167 h, (c). 1 h, (d). 5 h, (e). 25 h and (f). 30 h.

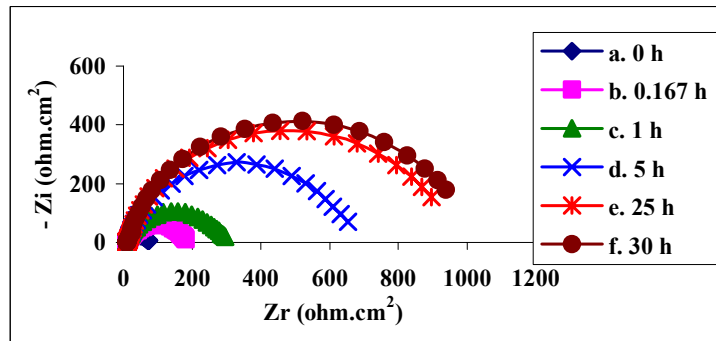


Figure 2. Nyquist plot of Type API 5L X65 carbon steel in 1% NaCl in the presence of 1000 ppm BTAH and CO₂ at 45°C after immersion times (a). 0 h, (b). 0.167 h, (c). 1 h, (d). 5 h, (e). 25 h and (f). 30 h.

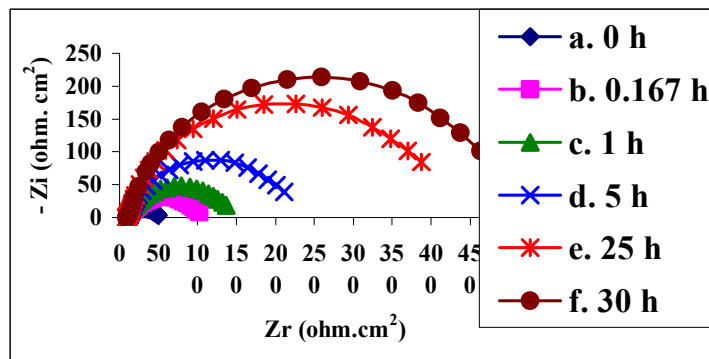


Figure 3. Nyquist plot of Type API 5L X65 carbon steel in 1% NaCl in the presence of 1000 ppm BTAH and CO₂ at 65°C after immersion times (a). 0 h, (b). 0.167 h, (c). 1 h, (d). 5 h, (e). 25 h and (f). 30 h.

the inhibition efficiency (I E) decreases as the temperature increases. The higher the temperature the lower is the inhibition efficiency. However, inhibition efficiencies at 85°C after immersion time of 25 and 30 hours are higher than those at 65°C after the same immersion times. Figure 6. shows the inhibition efficiency of BTAH on the corrosion of carbon

steel in NaCl solution in the presence of CO₂ as a function of temperature.

When the inhibition efficiency decreases the corrosion rate increases. At low temperatures (below 60 - 70°C) the corrosion rate increases (the inhibition efficiency decreases) as the temperature increases due to increase of mass transfer and charge transfer rates. At high

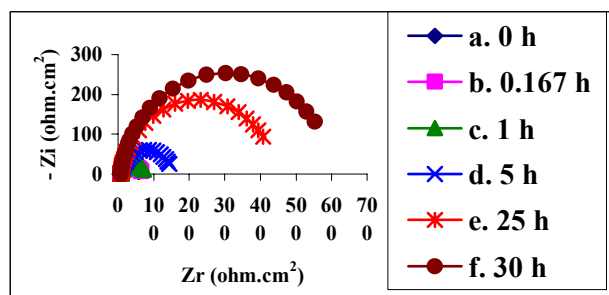


Figure 4. Nyquist plot of Type API 5L X65 carbon steel in 1% NaCl in the presence of 1000 ppm BTAH and CO₂ at 85°C after immersion times (a). 0 h, (b). 0.167 h, (c). 1 h, (d). 5 h, (e). 25 h and (f). 30 h.

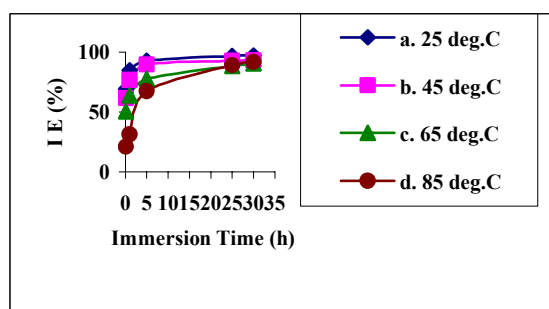


Figure 5. Effect of immersion time on the inhibition of 1000 ppm BTAH on the corrosion of Type API 5L X65 in 1% NaCl in the presence of CO₂ at temperatures (a). 25°C, (b). 45°C, (c). 65°C and (d). 85°C.

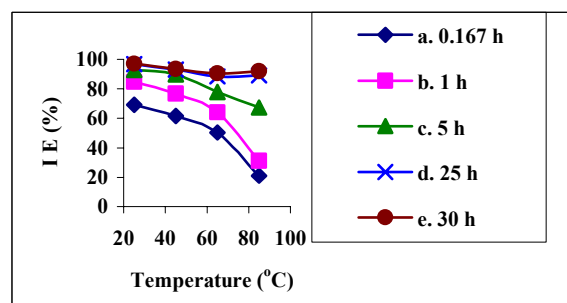


Figure 6. Effect of temperature on the inhibition of 1000 ppm BTAH on the corrosion of Type API 5L X65 in 1% NaCl in the presence of CO₂ after immersion times (a) 0.167 h, (b). 1 h, (c). 5 h, (d). 25 and (e). 30 h.

temperatures (above 80 - 100°C) the corrosion rate starts to decrease due to the formation of a protective scale as a result of decrease in both FeCO₃ and CO₂ solubility (Gunaltun, 1996). At the constant [Cl⁻] and pH, increases in temperature resulted in increases in the area of attack and greater dissolution rates of carbon steel (Brossia and Cragolino, 2000). The dependence of dissolution rate on temperature might have been a result of the dependence of reaction kinetics on temperature.

4. Conclusions

- This study has shown that inhibition efficiency of BTAH on the corrosion of Type API 5L X65 carbon steel in NaCl solution in the presence of CO₂ was dependent of immersion time at temperatures 25, 45, 65 and 85°C. The longer the immersion time the higher is the inhibition efficiency.
- The inhibition efficiency of BTAH on the corrosion of Type API 5L X65 carbon steel in NaCl solution in the presence of CO₂ was also dependent of

temperature at immersion times 0.167, 1, 5, 25 and 30 h. The higher the temperature the lower is the inhibition efficiency, although inhibition efficiencies at 85°C after immersion time of 25 and 30 hours are higher than those at 65°C after the same immersion times due to the decrease in FeCO₃ and CO₂ solubility.

5. Acknowledgment

This work was supported by the DUE-Like project of the Directorate General of Higher Education, Department of National Education, Indonesia.

6. References

Agarwal, P., Moghissi, O.C., Orazem, M.E., Garcia-Rubio, L.H., (1993). Application of Measurement Models for Analysis of Impedance Spectra, *Corrosion*, **49** (4) 278-289.

Babic, R., Metikos-Hucovic, M., Loncar, M., (1999). Impedance and Photochemical Study of Surface Layers on Cu and Cu-10Ni in Acetate Solution Containing Benzotriazole, *Electrochimica Acta*, **44**, 2413-2421.

Bentiss, F., Langrenee, M., Elmehdi, B., Mernari, B., Traisnel, M., Vezin, H., (2002). Electrochemical and Quantum Chemical Studies of 3,5-Di(n-Tolyl)-4-Amino-1,2,4-Triazole Adsorption on Mild Steel in Acidic Media, *Corrosion*, **58** (5) 399-407.

Brossia, C.S., Cragnolino, G.A., (2000). Effect of Environmental Variables on Localized Corrosion of Carbon Steel, *Corrosion*, **56** (5) 505-514.

Eldakar, N., Nobe, K., (1981). Effect of Substituted Benzotriazoles on The Anodic Dissolution of Iron in H₂SO₄, *Corrosion*, **37** (5) 271-278.

Eldakar, N., Nobe, K., (1977). Electrochemical and Corrosion Behavior of Iron in The Presence of Substituted Benzotriazoles, *Corrosion*, **33** (4), 128-130.

Frignani, A., Tommesani, L., Brunoro, G., Monticelli, C., Fogagnolo, M., (1999). Influence of The Alkyl Chain on The Protective Effects of 1,2,3-Benzotriazole toward Copper Corrosion, Part I: Inhibition of The Anodic and Cathodic Reactions, *Corrosion Science*, **41**, 1205-1215.

Gunaltun, Y.M., (1996). *CO₂ and H₂S Corrosion in Oil and Gas Production Systems*. One Day Seminar, Institut Teknologi Bandung., p 1-44.

Jinturkar, P., Guan, Y.C, Han, K.N., (1998). Dissolution and Corrosion Inhibition of Copper, Zinc, and Their Alloys, *Corrosion*, **54** (2), 106-114.

Matos, J.B., Elia, E.D., Barcia, O.E., Mattos, O.R., Pebere, N., Tribolett, B., (2001). Rotating Disc and Hemispherical Electrodes for Copper Dissolution Study in Hydrochloric Solution in The Presence of Benzotriazole, *Electrochimica Acta*, **46**, 1377-1383.

Quraishi, M.A and Sardar, R., (2002). Aromatic Triazoles as Corrosion Inhibitors for Mild Steel in Acidic Environmentals, *Corrosion*, **58** (9), 748-755.

Walker, R., (2000). Aqueous Corrosion of Tin-Bronze and Inhibition by Benzotriazole, *Corrosion*, **56** (12). 1211-1219.

Studi Struktur Fungsi Karboksi Terminal eRF1 *Saccharomyces cerevisiae*

P.E. Susilowati¹⁾, Subandi²⁾, F. Madayanti¹⁾, P. Aditiawati³⁾ dan Akhmaloka¹⁾

1) Departemen Kimia, ITB
Jl Ganesha 10, Bandung, Indonesia
e-mail: loka@chem.itb.ac.id

2) Jurusan Kimia, Univ Negeri Malang
Jl Surabaya 6, Malang, Indonesia
e-mail: subandi@lycos.com

3) Departemen Biologi, ITB
Jl Ganesha 10, Bandung, Indonesia

Abstrak

Protein eRF1 diketahui berperan pada proses terminasi translasi di sistem eukariot termasuk *Saccharomyces cerevisiae*. Studi struktur kristal protein eRF1 manusia menyarankan adanya tiga domain, yaitu domain I pada daerah ujung N, domain II ditengah protein dan domain III pada daerah ujung C. Interaksi eRF1 dengan eRF3 diprediksikan terjadi pada domain III. Analisis struktur eRF1 dilakukan dengan mengirimkan urutan asam amino melalui e-mail ke SwissProt Automated Protein Modelling Server, dan dianalisis dengan program Rasmol dan VMD. Hasil analisis menunjukkan posisi residu tirosin (Y⁴¹⁰) dan treonin (T²⁹⁵) terletak pada permukaan molekul dan lekukan turn. Kedua residu ini diduga berperan penting dalam interaksi eRF1-eRF3, karena residu fungsional umumnya terletak pada permukaan molekul dan lekukan turn. Untuk mempelajari peran kedua residu ini akan dilakukan studi mutagenesis. Pemilihan asam amino pengganti didasarkan pada dua pendekatan, yaitu peranan ikatan hidrogen dan keruahan molekul rantai samping. Untuk mengetahui peranan ikatan hidrogen, tirosin (Y⁴¹⁰) diganti dengan fenilalanin (F⁴¹⁰), dan treonin (T²⁹⁵) diganti dengan alanin (A²⁹⁵). Sedangkan untuk mengetahui peranan halang ruang rantai samping, tirosin (Y⁴¹⁰) diganti dengan serin (S⁴¹⁰) dan treonin (T²⁹⁵) diganti dengan serin (S²⁹⁵). Dari hasil komputer analisis struktur tersier (3D) menyarankan meskipun terjadi mutasi Y410S, Y410F, T295S dan T295A pada eRF1, struktur keseluruhan protein itu tidak berubah. Untuk memperoleh mutan-mutan tersebut, akan dilakukan mutasi terarah (Site Directed Mutagenesis) menggunakan PCR. Primer dirancang menggunakan program komputer "Genmon" dan "Primer Detectif". Mutasi untuk mengubah residu tirosin (Y⁴¹⁰) menjadi serin (S⁴¹⁰) telah dilakukan dan menyebabkan kinerja eRF1 pada proses terminasi translasi menurun sampai 78% dari semula.

Kata kunci: eukaryote release factor (eRF), SUP45, *Saccharomyces cerevisiae*, terminasi translasi

1. Pendahuluan

Biosintesis protein (proses translasi) merupakan tahap akhir ekspresi gen. Proses ini terdiri dari tahap inisiasi, elongasi dan terminasi. Mekanisme inisiasi dan elongasi pada sistem prokariot dan eukariot relatif telah banyak diketahui, disamping itu mekanisme terminasi translasi pada prokariot juga telah banyak dipelajari. Sedangkan mekanisme terminasi translasi untuk eukariot sampai

sekarang belum banyak diketahui. Protein eRF1 diketahui berperan pada proses terminasi translasi di sistem eukariot termasuk *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil studi kristal protein eRF1 manusia menyarankan adanya tiga domain, yaitu domain I pada daerah ujung N, domain II ditengah protein dan domain III pada daerah ujung C. Diprediksikan interaksi eRF1 dengan eRF3 terjadi pada domain III. Kajian mekanisme terminasi translasi pada S.

cerevisiae dan sistem eukariot khususnya interaksi protein eRF1 dengan eRF3 dipandang sangat menarik, karena dari hasil penelitian terdahulu baru diketahui bahwa daerah interaksi eRF1 dengan eRF3 terletak pada residu asam amino ke 281-305 dan 411-415 (GILRY) (Merkulova, *et al.*, 1999).

Dalam penelitian ini telah dilakukan komputer analisis pada residu tirosin (Y^{410}) dan treonin (T^{295}). Pemilihan asam amino pengganti didasarkan pada dua pendekatan, yaitu peranan ikatan hidrogen dan halang ruang rantai samping. Untuk mengetahui peranan ikatan hidrogen, tirosin (Y^{410}) diganti dengan phenilalanin (F), dan treonin (T^{295}) diganti dengan alanin (A). Sedangkan untuk mengetahui peranan halang ruang rantai samping, tirosin (Y^{410}) diganti dengan serin (S), dan treonin (T^{295}) diganti dengan serin (S). Perubahan rantai samping asam amino eRF1 diharapkan berpengaruh terhadap kemampuan interaksinya dengan eRF3.

2. Percobaan

Prediksi Struktur Tiga Dimensi eRF1

Saccharomyces cerevisiae

Mengirim urutan nukleotida gen *SUP45 wild type* dan mutan ke Swiss Prot. Hasil data prediksi struktur 3D protein eRF1 yang dikirim oleh Swiss Prot (dalam bentuk file pdb), selanjutnya dianalisis. Program untuk menganalisis struktur 3D protein ini bisa diperoleh dari internet. Dengan menggunakan program ini struktur 3D protein eRF1 *wild type*

dan mutan dianalisis.

Perancangan Primer Mutan

Primer diperlukan untuk pembuatan mutan dengan mutasi terarah (*Site Directed Mutagenesis*) menggunakan PCR. Perancangan primer dilakukan menggunakan program komputer "Genmon" dan "Primer Detectif".

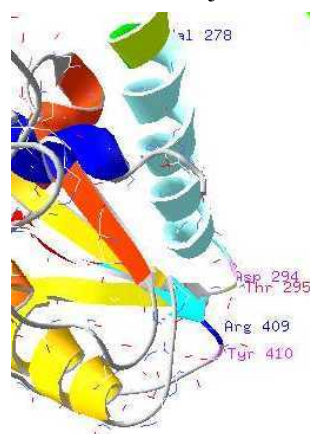
3. Hasil dan Pembahasan

Prediksi Struktur Tiga Dimensi eRF1

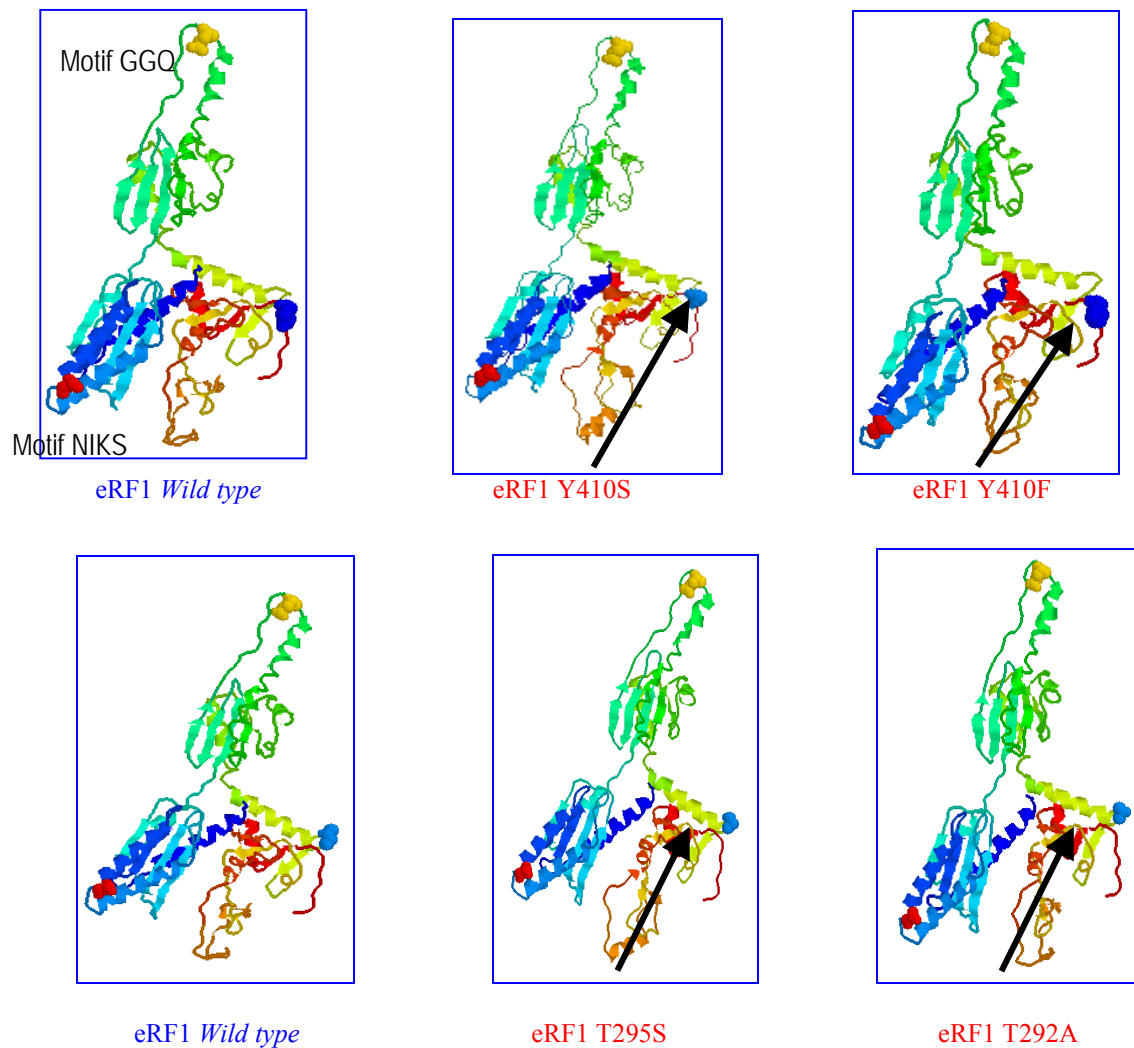
Saccharomyces cerevisiae

Studi oleh Merkulova dan kawan-kawan (1999) terhadap mutan-mutan delesi eRF1 manusia (homolog 68% dengan eRF1 ragi) menyarankan bahwa daerah interaksi eRF1 terhadap eRF3 berada di dua tempat, yaitu pada daerah residu 278-305 eRF1 manusia (identik dengan residu 278-302 eRF1 ragi) dan residu bermotif GILRY pada posisi 411-415 eRF1 manusia (identik dengan residu AMLRY pada posisi 406-410 eRF1 ragi).

Prediksi struktur 3D terhadap protein eRF1 *saccharomyces cerevisiae* mengacu pada hasil analisis protein sejenis (eRF1 manusia) yang sudah diketahui struktur 3D nya melalui analisis kristal protein. Hasil analisis komputasi, menyarankan residu treonin (T^{295}) dan tirosin (Y^{410}) terlibat langsung dalam interaksi dengan eRF3. Hal ini didukung oleh data berikut. Pertama, residu treonin (T^{295}) dan tirosin (Y^{410}) terletak di permukaan protein. Kedua, residu treonin (T^{295}) dan tirosin (Y^{410}) berada pada lekukan *turn* (Gambar 1.). Data ini sejalan dengan posisi-posisi residu sisi aktif



Gambar 1. Residu pada dua buah lekukan *turn* eRF1 diduga merupakan tempat interaksi dengan eRF3. Pada lekukan pertama terdapat aspartat²⁹⁴ dan treonin²⁹⁵, sedangkan pada lekukan kedua tirosin⁴¹⁰ dengan arginin⁴⁰⁹ disampingnya (Subandi, 2002).



Gambar 2. Struktur 3D eRF1 *wild type* dan mutan (Y410S, Y410F, T295S dan T295S). Pada eRF1 *wild type* posisi 295 dan 410 masing-masing adalah treonin (T295) dan tirosin (Y410). Pada masing-masing mutan posisi tirosin digantikan oleh serin (mutan Y410S) dan fenilalanin (mutan Y410F). Pada posisi treonin digantikan oleh serin (mutan T295S) dan alanin (mutan T295A). Struktur keseluruhan kelima protein tidak berbeda

yang lain pada eRF1 (motif GGQ dan NIKS), juga terletak pada permukaan protein dan lekukan *turn*.

Mutasi titik (*point mutation*) pada gen *SUP45 S. cerevisiae* telah dilakukan dengan cara mutasi terarah (*Site Directed Mutagenesis*). Nukleotida ke 1229 gen eRF1 diubah dari A menjadi C, sehingga kodon ke 410 eRF1 berubah dari TAC (kodon tirosin) menjadi TCC (kodon serin). Hasil uji interaksi antara eRF1 mutan Y410S dan *wild type* dalam berinteraksi dengan eRF3, menunjukkan eRF3 yang terikat pada eRF1 mutan hanya sekitar 22% dibanding yang terikat pada eRF1 *wild type*. Hasil ini

menyandakan bahwa mutasi tirosin (Y) menjadi serin (S) pada posisi ke-410 eRF1 telah mengurangi daya interaksi protein ini terhadap eRF3, dan menyebabkan kinerja eRF1 pada proses terminasi translasi menurun. Hal ini mengindikasikan bahwa posisi mutasi (Y⁴¹⁰) pada eRF1 ragi berperan penting dalam mempertahankan interaksinya dengan eRF3. Disamping itu, masih adanya kemampuan eRF1 mutan untuk mengikat eRF3, mengindikasikan bahwa titik interaksi eRF1 terhadap eRF3 lebih dari satu tempat (Subandi, 2002). Indikasi ini sesuai dengan percobaan terdahulu yang membuktikan bahwa

Tabel 1. Rancangan Primer Mutan

Primer	Urutan primer	Self homology	Cross homology	Tm (°C)	%GC	% Homologi
RPB	GCGAAAGGGGGATGTG (nt: 16)	–	–	49	62,5	63 %
FPK	CTTCCAGTTCTTCAACCAG (nt: 19)	–	–	49	47,4	63 %
Mutan Serin 1	GGTCCTG <u>AGT</u> CCATTTAAGAC (nt:21)	–	–	52	47,6	52 %
Mutan Serin 2	GTCTTAAATGG <u>ACT</u> CAGGACC (nt:22)	–	–	52	47,6	52 %
Mutan Alanin 1	GGTCCTG <u>CGT</u> CCATTTAAGAC (nt:21)	–	–	54	52,4	57 %
Mutan Alanin 2	GTCTTAAATGG <u>ACG</u> CAGGACC (nt:21)	–	–	54	52,4	57 %
Mutan Fenilalanin	GTACGACGCAA <u>AGT</u> TTCAATTA AAA (nt:25)	–	–	51	32	60%

titik interaksi pada eRF1 manusia (terhadap eRF3) berada di dua tempat (Merkulova *et al.*, 1999).

Perubahan fungsi eRF1 mutan Y410S, terutama dalam interaksinya dengan eRF3, diduga disebabkan oleh perubahan sudut dan panjang ikatan $-\text{CH}_2-\text{OH}$ karena perubahan rantai samping tirosin ($-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$) berubah menjadi rantai samping serin ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Perubahan rantai samping itu juga diprediksikan menyebabkan hilangnya sebagian tonjolan permukaan protein, sehingga daya interaksinya dengan eRF3 menurun (Subandi, 2002).

Hasil analisis komputasi struktur tersier (3D) menyarankan meskipun terjadi mutasi Y410S, Y410F, T295S dan T295A pada eRF1, struktur keseluruhan protein itu tidak berubah. Ini disebabkan mutasi tersebut tidak menyebabkan perubahan pada bentuk rantai eRF1 (Gambar 2).

Perancangan Primer Mutan

Primer dirancang berdasarkan *template* yang akan digunakan, yaitu gen *SUP45* (terdapat pada plasmid pUKC1901). Parameter dalam merancangan primer, antara lain: %GC cukup tinggi ($\geq 50\%$); harga Tm (*melting point*) antar pasangan primer hampir sama (perbedaan $\leq 5^\circ\text{C}$); tidak *Self homology*; tidak *Cross homology* antar pasangan primer (pembuatan

mutan); *mispriming* sedikit. Berdasarkan parameter tersebut, telah diperoleh primer untuk mutan eRF1 (Tabel 1.).

Urutan primer mutan ditentukan berdasarkan posisi dan perubahan basa yang akan dimutasi, karena posisi mutasi sudah pasti maka primer mutan hanya dimodifikasi jumlah basanya untuk memenuhi syarat primer yang baik. Primer RPB (daerah *reverse*) dan FPK (*Forward*) ditentukan menggunakan program komputer “Primer Detectif” dan semi manual.

4. Kesimpulan

Analisis komputasi struktur tersier (3D) menyarankan residu treonin (T^{295}) dan tirosin (Y^{410}) terlibat langsung dalam interaksi dengan eRF3. Meskipun berdasarkan analisis komputasi mutasi Y410S, Y410F, T295S dan T295A pada eRF1 tidak menyebabkan perubahan yang berarti pada keseluruhan struktur protein, hanya menyebabkan berkurangnya tonjolan permukaan.

Sudah diperoleh rancangan primer untuk pembuatan mutan eRF1, berdasarkan parameter-parameter yang harus dipenuhi oleh primer.

5. Daftar Pustaka

Akhmaloka, Subandi, M.R. Moeis, S. Soedigdo (2002). Probing The Role of *SUP45* Gene Product of Translation Termination Process: Case study of

- sup45* Y410S. Seminar Bersama UKM-ITB ke V, Melaka, Malaysia.
- Betram, G., S. Innes, O. Minella, J.P. Richardson, I. Stansfield (2001) Endless Possibilities: Translation Termination and Stop Codon Recognition, Review Article, *microbiology*, **147**: 255-269
- Eurwilaithtr, L., F.M. Graves, L. Stansfield, M.F. Tuite (1999), The C-Terminus of eRF1 Defines a Functionally Important Domain for Translation Termination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbial*, **32**: 485-496
- Frolova, L.Y., Simonsen, J., Merkulova, T., Litvinov, D., (1998). Functional Expression of Eukaryotic Polypeptide Chain Release Factor 1 and 3 by Means of Baculovirus/ Insect Cells and Complex Formation between the Factor, *Eur.J.Biochem*, **256**:36-44
- Frolova, L.Y., R.Y. Tsivkovskii, G.F. Sivolobova, N.Y. Oparina, O.I. Serpinsky, V.M. Blinov, S.I. Tatkov, L.L. Kisselev, (1999). Mutation in highly conserved GGQ Motif of Class 1 Polypeptida Release Factors abolishes ability of Human eRF1 to Trigger Peptidyl-tRNA Hydrolysis, *RNA*, **5**: 1014-1020
- Inagaki, Y., C. Blouin, W.F. Doolittle, A.J. Roger (2002) Convergence and Constraint in Eukaryotic Release Factor 1 eRF1 is Primary Binding Site for eRF3 of Fission Yeast, *J. RNA*, **4**: 958-972
- Ma, B., T. Elkayam, H. Wolfson, R. Nussiriov (2003) Protein-protein Interactions: Structurally Conserved Residues Distinguish between Binding Sites and Exposed Protein Surfaces, *PNAS*, **vol. 100 no.10**: 5772-5777
- Merkulova, T.I., L.Y. Frolova, M.Lazar, J. Camonis, L.L. Kisselev, (1999). C-Terminal Domain of Human Translasi Termination Factor eRF1 and eRF3 Mediate their *In Vivo* Interaction, *FEBS Letter*, **443**: 41-47
- Mugnier, P., and M.F. Tuite (2001) Mini-Review: Translation Termination and its Regulation in Eukaryotes: Recent Insights by Studies in Yeast, *Biokhimia*, **64**: 1360-
- Subandi, (2002). Pengaruh Mutasi Y410S eRF1 pada Interaksi eRF1-eRF3 *Saccharomyces cerevisiae*, Disertasi Doktor, ITB, Bandung

The identification of compounds from liverwort *Plagiochila sandei* Dozy

Pudjiastuti, P¹⁾, Suwito, H¹⁾, Nurul, A.¹⁾ Nugroho, DA¹⁾, Kosela, S.²⁾, Suwarso, W.P.²⁾, Dai³⁾, Krohn, K.³⁾

1) Faculty of Science, Airlangga University, Surabaya

2) Faculty of Science, University of Indonesia, Jakarta

3) Institute of Organic Chemistry, University of Paderborn, Germany

Abstract

The liverwort *Plagiochila sandei* Dozy belongs to the family Plagiochilaceae which is grows on soil, cold and wet places in Indonesia. Research into *Plagiochila sandei* Dozy species has not been reported yet. In this paper, the identification of compounds as well as structure elucidation of this plant is reported. *Plagiochila sandei* Dozy was collected from Mount Halimun, Sukabumi, West of Jawa, Indonesia. It was collected in March 2004. The dried sample was powdered mechanically and extracted with ether to provide the crude extract. In the same time the sample was also extracted using *n*-hexane and methanol, sequentially giving crude and methanol extracts. After removing of the solvents, the crude extract of ether was purified by column chromatography on silica gel using (*n*-hexane-acetone) gradient system. Number fractions of 11-16 were then analysed using GC-MS. The GC-MS data showed that this fractions consist of fatty acids, viridiflorol, maliaan-5-ol, 2(3), 5(6)-fusicoccadien and fusicogigantepoxide. After separated and purification with silica gel, Cosmosil 75C18 and Sephadex LH-20 and the mobile phase were used (*n*-hexane-EtOAc) and (*n*-hexane-acetone) gradient system and (CHCl₃ : MeOH=1:1), respectively, three crystalline solid were obtained. The structures were determined based on 400 and 500 MHz Bruker FTNMR spectrometers showed the existence ethyl-*p*-methoxy cinnamic (EPMC), derivate of glycerol and ent-spathulenol.

Key words: liverwort, *Plagiochila sandei* Dozy, EPMC, derivate of glycerol, ent-spathulenol

1. Introduction

Plagiochila is a genus which belongs to the hepaticae group. More than 3000 species of *Plagiochila* are widely distributed in the world and 400-450 morphospecies is the largest genus of leafy liverworts. Indonesia has two species of *Plagiochila*, there are *Plagiochila javanica* and *Plagiochila sandei* Dozy. They belong to the family *Plagiochilaceae* grows on soil, cold and wet places. The chemical constituents of *Plagiochila javanica* are maalioidide and cyclocoloronon (Matsuo *et al.*, 1974) and bicyclohumulenon (Matsuo *et al.*, 1979). Pudjiastuti *et al.* (2005) reported that GCMS analysis of ether fraction showed that some peaks of fatty acids, maalian-5-ol, ent-spathulenol and two diterpenes 2(3),5(6)-fusicoccadien and fusicogigantepoxide. In this paper, we report our further research into

chemical constituents of *Plagiochila sandei* Dozy from *n*-hexane and methanol extracts. Compounds **1**, **2** and **3** were identified as ethyl-*p*-methoxy cinnamic (EPMC), derivate of glycerol and ent-spathulenol .

2. Experimental

General:

¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra were taken on Bruker AM spectrometer 400 and 500 MHz. MS spectra was performed on GC-MS HP and were analysed by comparison with library data. TLC was conducted on silica gel GF₂₅₄ (E. Merck). Purification was carried out on silica gel G 60, Cosmosil 75C18 and Sephadex LH-20.

Isolation and purification

Plagiochila sandei Dozy was collected from Mount Halimun, Sukabumi, West of Jawa,

Indonesia. It was collected in March 2004. Samples were powdered mechanically and 140g of sample was extracted with ether, whereas 1125 g of the sample was extracted sequentially using n-hexane and methanol. After removing of the solvents, the three crude extracts were purified by column chromatography many times on silica gel Merck 60, Cosmosil 75C18 and Sephadex LH-20. The mobile phase were used (n-hexane-EtOAc), (n-hexane-acetone) gradient system and (CHCl₃:MeOH=1:1), respectively. The isolated compounds were identified with GCMS HP instrument for analysis of the ether with number fractions 11-16 and three structures from n-hexane and methanol fractions of **1** (2 mg), **2** (3 mg) and **3** (5 mg) were determined using 400 MHz and 500 MHz Bruker FTNMR spectrometers.

3. Results and Discussions

Compound 1:

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.29 (*t*, 3H), 3.86 (*s*, 3H), 4.30 (*q*, 2H), 6.34 (*d*, 1H), 6.93(*dd*, 4H, J=9.7 Hz), and 7.50 (*dd*, 4H, J=9.7 Hz), 7.65 (*d*, 1H).

¹³C-NMR (δ ppm): 14.1, 55.3, 60.3, 114.9, 126.6, 129.7, 131.3, 145.5, 159.9, and 172.4

Compound 2:

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 1.35 (*t*, 3H), 2.50 (*s*, 3H), 3.75 (*m*, 4H), 3.85 (*s*, 3H), 3.95 (*m*, 2H), and 6.27-8.30 (*dd* of 14 crowded peaks, 12 H)

¹³C-NMR (δ ppm): 14.1, 21.0, 50.9, 111.8, 114.3, 115.6, 122.1, 124.6, 125.7, 126.0, 126.7, 127.7, 128.6, and 129.7

Compound 3:

¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 0.86 (*s*, 9H), 1.23 (*m*, br), 1.25 9 (*m*, br), 3.63 (*s*, 3H) and 7.24 (*d*, 2H)

The ¹H-NMR of **1** displayed the proton signals methyl at δ 1.29 (*t*, 3H), and methoxy groups at δ 3.86 (*s*, 3H). One methylene proton at δ 4.30 (*q*, 2H) was attached to the ester and methyl group. Two double bonds of methyne were represented by signal at δ 6.34 (*d*, 1H) and 7.65 (*d*, 1H) which were attached between ester and aromatic groups. Remaining proton signals were observed at δ 6.93 (*dd*, 4H, J=9.7 Hz) also 7.50 (*dd*, 4H, J=9.7 Hz) as AB type doublet

assignable to *ortho* and *para* located aromatic protons, respectively.

The ¹³C-NMR and DEPT experiment of **1** disclosed the presence of two methyl carbons at δ 14.1 and 55.3 ppm, one methylene carbon at δ 60.3, five methine carbons and one quaternary carbon were also observed. Two peaks were longer than the others at δ 114.9 and 129.7 and quaternary carbon of carbonyl ester at 172.4 ppm were observed.

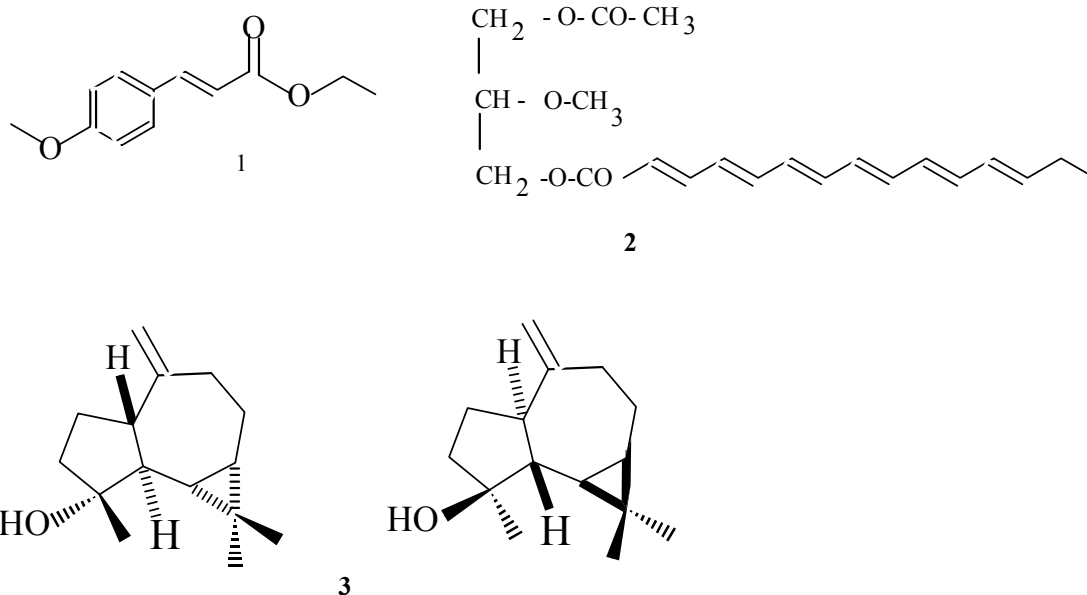
The ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum were also compared to the previous publication data of Tanjung, 1997. From the above data, it was concluded that compounds **1** is ethyl-*p*-methoxy cinnamic (EPMC). This compound is a constituent has insecticidal properties found in four species of zingerberaceae, namely *Curcuma galanga*, *C. zedoaria*, *Kaempferia galanga* and *K. pandurata* (Panji *et al.*, 1993)

Compound 2:

The ¹H-NMR spectrum of **2** represented three kinds of proton signals methyl at δ 1.35 (*t*, 3H), methyl carbonyl (CH₃-CO-) at δ 2.50 (*s*, 3H), and methoxy group at δ 3.85 (*s*, 3H). Three methylene groups were observed, two were displayed as proton signals indicating two methylenes attached to a methyne groups as (-CH₂-CH-CH₂-) at δ 3.75 (*m*, 4H) and the other one as a signal bonded between a double bond and methyl group at δ 3.95 (*m*, 2H). The complex conjugate proton signals of methyne appeared at δ 6.27-8.30 (*dd* of 14 crowded peaks, 12 H).

The ¹³C-NMR and DEPT experiments of **2** exhibited the presence of three methyl carbon signals at δ 14.1, 21.0 and 50.9 ppm, three methylene carbon signals at δ 22.5, 31.6 and 60.4 ppm also one methyne carbon at δ 55.4 ppm were observed. Eleven conjugated double bond methyne carbon signals (one peaks is longer than the other) were detected at δ 111.8, 114.3, 115.6, 122.1, 124.6, 125.7, 126.0, 126.7, 127.7, 128.6, and 129.7 ppm. Two faint signals indicating two carbonyl ester groups signals. One signal is conjugated with double bond of methine group and the other one (very small signal). Based on the datas, compound **2** can be identified as glycerol derivate.

Compound 3:



The $^1\text{H-NMR}$ spectrum data of compound **3** indicated the proton signals of three methyl groups at δ 0.86 (s, 9H), two broad signals coupled with each other were methylene also methyne groups interaction at δ 1.23 (*m*, br) and 1.25 (*m*, br). The proton signal of hydroxy groups appeared at δ 3.63 (s, 3H) and *exo* methylene group at δ 7.24 (d, 2H) were observed. The GCMS analysis showed the presence of **3** as the major component. Further supporting the evidence of **3** came from a comparison with some reference (Asakawa, *et al.*, 2003). Compound **3** can be identified as a sesquiterpene alcohol called spathulenol and it always exists with its enantiomeric pair. More than 400 paper concerning the detection and isolation of *ent*-spathulenol in the species of liverworts have been reported (Toyota, *et al.*, 1996).

4. Conclusion

Compounds from n-hexane and methanol extracts of liverwort *Plagiochila sandei* Dozy can be identified as ethyl-*p*-methoxy cinnamic (EPMC) **1**, derivate of glycerol **2** and *ent*-spathulenol **3**.

5. Acknowledgement

The authors acknowledge Prof. Robb Gradstein for identification of plant material and Dr. Agustino Zulys also Moch. Rully of Free University, Berlin, Germany for NMR 400 MHz measurement.

6. References

- Asakawa, Y., Toyota, M., Konrat, MV., Braggin, J.E., 2003, *Phytochemistry*, 62, 439-452
- Heinrichs, J., Groth, H., Lindner, M., Renker, C., Pocs, T., Proschold, T., 2004, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164, 469-481
- Matsuo, A, Nakayama, M., Sato, S., Nakamoto, T., Uto, S., Hayashi, S., *Experientia*, 30, 4, 321-322
- Matsuo, A, Nozaki, H., Kataoka, H., Kumori, T., Kamijo, N., Nakayama, M., Hayashi, S., *Journal of the Chem. Soc., Chem. Comm*, 4, 174-175
- Panji, C., Grim, C., Wrang, V., Witte, L Proksch, P, 1993, *Phytochemistry*, 34, 12, 415-419
- Pudjiastuti, P., Winiati, S., Cahyana, H., Kosela, S., Harinantenaina, L., Hashimoto, T., Asakawa, Y., 2005, *Journal Natural Product Research* (Submit)
- Tanjung, M., 1997, Isolasi dan Rekayasa Senyawa turunan Sinamat dari *Kaemferia galanga* L. Sebagai Tabir Surya, Laporan Penelitian, Lemlit, Universitas Airlangga,



Synthesis, characterization and biological activities of substituted salicylaldehyde-hydrazone and their metal complexes

Hapipah Mohd Ali¹, Puvaneswary Subramaniam¹, Endom Ismail², Nordin Hj. Lajis³, Sharifudin M. Zain¹, Wan Jefri Basirun¹ and Ng Seik Weng¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia,
²School of Chemical Sciences and Food Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia.
³Institut Biosains, Laboratory Natural Product, University Putra Malaysia, 43400, Serdang, Malaysia
hapipahali@yahoo.com, Fax: 603-79674193, 019-3782538

Abstract

Several new benzoylhydrazone had been prepared in ethanol by condensation of benzhydrazide with substituted salicylaldehyde. Metal complexes had been obtained by template condensation by reacting metal acetate ($M = \text{Zn}$ and Ni) with the Schiff bases in the presence of triethylamine. The IR, UV-Vis, TGA, ^1H and ^{13}C NMR data indicate the Schiff bases are coordinated to metal via O, N, O atoms. The Schiff base ligands and the metal complexes are tested against the MCF-7 cancer cell-lines (human breast cancer cells) and the IC_{50} values were determined and compared to the positive control drug, tamoxifen. The antioxidant property was also investigated on both ligands and complexes. The results are comparable to antioxidant activity of quercetin, vitamin E or butylated hydroxytolouene (BHT).

Keywords: Substituted salicylaldehyde-hydrazone Schiff bases, metal complexes, Cytotoxicity and antioxidant properties

1. Introduction

Schiff bases have been used extensively as ligands in the field of coordination chemistry and they find extensive application in different fields. In recent years, the formation of metal complexes of Schiff bases have attracted considerable attention due to their remarkable biological activities such as antibacterial, antifungal, antitumour and antiviral [1]. Schiff bases derived from the salicylaldehydes are well known polydentate ligands coordinating in neutral forms [2]. Ligand of salicylaldehyde benzoylhydrazone and its Cu(II) complex was shown to be a potent inhibitor of DNA synthesis and cell growth in a variety of human and rodent cell lines [3,4]. Apart from that, substituted salicylaldehyde ligands and their metal complexes are also of great biological importance. In 1992, Zischen *et al* [5] reported Schiff base complexes derived from 4-hydroxysalicylaldehyde and amines have

strong antifungal activity towards two fungi, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. However, complexes of Schiff base ligands derived from substituted salicylaldehyde have been studied less compared to the unsubstituted salicylaldehyde.

Due to that, the present work considers the synthesis and characterization of the ligands derived from substituted salicylaldehyde and an aromatic amine namely benzhydrazide. The electron-donating and electron-withdrawing substituents are 5-chloro, 5-nitro, 5-methoxy, 5-bromo and 5-bromo-3-methoxy. The ligands and their complexes with Zinc(II) and Nickel(II) were characterized by infrared (IR) spectra, ultraviolet-visible (UV) spectra, ^1H and ^{13}C NMR spectra, thermogravimetric analysis (TGA) and X-ray studies. The effect of the substituents on the cytotoxicity and antioxidant activity of the ligands and the complexes were

hours incubation period. Again, the medium

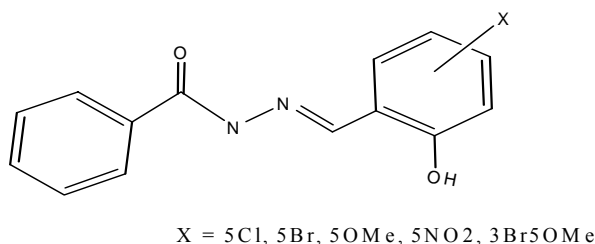


Fig.1: Substituted salicylaldehyde-benzoylhydrazone ligand

also investigated.

2. Experimental

All reagents were commercially available from Fluka or Aldrich and were used without further purification.

2.1. Ligand

The Schiff base ligand was prepared by condensation of ethanolic solution of benzhydrazide with equimolar amounts of substituted salicylaldehyde for 2 hours. The structure of the ligand is depicted in Fig.1.

The complexes were synthesized by stirring and refluxing the Schiff base ligand with metal acetate in ethanol in the presence of triethylamine for 5 hours. The solid was filtered and recrystallized from pyridine.

2.2. Bioactivity

Cytotoxicity activity was evaluated at Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor.

2.2.1. Culture of cells and cytotoxic assay

Cytotoxicity Assay

The technique used was described by Freshney [6] with some modification.

MCF-7 (human breast cancer cells) were seeded into 96 well plates at an initial cell density of approximately 5×10^5 cells cm^{-3} . After 24 hours incubation for cell attachment and growth, the medium was removed and replaced with fresh medium containing varying concentrations of organic compounds. The compounds added were first dissolved in DMSO at the required concentration. Subsequent 6 desirable concentrations was prepared using growth medium. Control wells received only DMSO. Each concentration of the compound under study was assayed in six replicates. The assay was terminated after 24

was removed and the cell viability was determined after further 4 hours incubation with 5 mg cm^{-3} MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium] bromide; also named as thiazol blue). DMSO was then added per well and the dissolving formazan precipitate was read by using elisa plate reader, Dynatech MR5000 at 570 nm. For comparison studies, tamoxifen was used as a positive control.

IC_{50} value is taken from the plotted graph of percentage live cells compared to control (%) versus tested concentration of compounds ($\mu\text{g cm}^{-3}$). The IC_{50} value is the concentration required for 50% growth inhibition. It represents the growth inhibitory (cytostatic) effects on cell viability of the compounds tested [7].

2.2.2 Antioxidant assay

Ferric thiocyanate (FTC) method

The antioxidant properties were assessed at Laboratory of Natural Products, Institute of Bioscience, University Putra Malaysia, Serdang, Selangor. This assay was carried out as described in the modified method of Kikuzaki and Nakatani [8]. A mixture of 2 mg of the test sample in 4 ml of 99.5% ethanol, 4.1 ml of 2.51% linoleic acid in 99.5% ethanol, 8.0 ml of 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) and 3.9 ml of distilled water contained in screw-cap vial (\varnothing 38 x 75 mm) was placed in an oven at 40°C in the dark. To measure the extent of antioxidant activity, 0.1 ml of the reaction mixture was transferred to a test tube ($\varnothing = 13$, $h = 150$ mm) and followed by addition of 9.7 ml of 75% (v/v) aqueous ethanol, 0.1 ml of 30% aqueous ammonium thiocyanate and 0.1 ml of 0.02 M ferrous chloride in 3.5% hydrochloric acid. Three min after the addition of ferrous chloride to the reaction mixture, the

Table 2: Selected IR bands for ligands and complexes in cm^{-1}

Compounds	OH of PhOH	N-H	C=O	C=N	N-N
LOMe	-		1639	1572	1045
LCI		3218	1642	1609	1023
LBr			1650	1613	1083
LNO ₂	3306		1635	1588	1075
Zn[LNO ₂] ₂	3300		-	1600	1192
Zn[LBr] ₂				1610	1177

absorbance of red colour (conversion to Fe^{3+}) was measured at 500 nm. The measurement was taken every 24 h interval one day after absorbance of the control reached its maximum value.

3. Results and Discussions

The Zn(II) and Ni(II) complexes are yellow and red in colour respectively, non-hygroscopic and stable in air. They are insoluble or sparingly soluble in common organic solvents and quite soluble in DMSO and pyridine. All the complexes melt over 250 °C.

3.1. IR Spectra

The IR spectra of the complexes when

compared to that of free ligands show that the $\nu(\text{N-H})$ of the free ligand disappears in the spectra of the complexes supporting deprotonation of the ligand upon complex formation. The $\nu(\text{C=O})$ bands of the free ligand also disappears in the spectra of the complexes indicating destruction of the keto group presumably *via* enolisation of the ligands and facilitates the formation of metal complexes. The ligands also showed strong band at around 1602 cm^{-1} which are assigned as the $\nu(\text{C=N})$ bands. In the metal complexes, this stretching band has shifted to lower frequencies, due to the lowering of the $\nu(\text{C=N})$ bond order as a result of metal-nitrogen bond formation. The

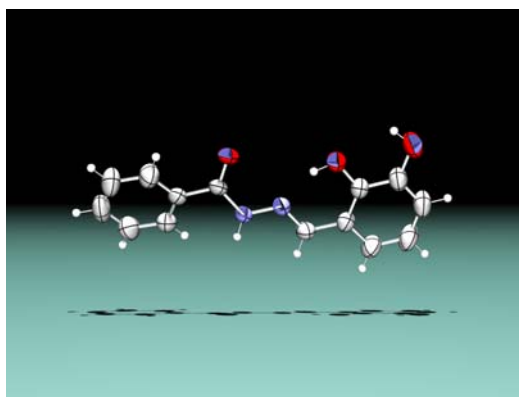


Fig. 2a: 3-hydroxysalicylaldehyde-benzoylhydrazone



Fig. 2a: 3-hydroxysalicylaldehyde-benzoylhydrazone

shifting of the $\nu(\text{N-N})$ to higher wavenumbers further support coordination of the ligand via the azomethine nitrogen atom.

3.2. X-ray Crystallographic studies

A yellow crystal of the ligand or zinc(II) complex was mounted on a glass fiber. The crystal data was collected with a Bruker SMART APEX CCD diffractometer using Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$). The intensities were collected using the $\omega - 2\theta$ scan mode, in the range of $2.4 < \theta < 27.0^\circ$. The structures were solved by direct methods and refined on F^2 by using the SHELXTL software pack.

4. Conclusions

The new Zn(II) complex with 2-nitro-5-chlorobenzaldehyde-4-nitrobenzoylhydrazone ligand has yielded a monomer in pyridine. The biological activities of the ligands and complexes are not available yet.

6. References

- [1] M. Sönmez and M. Şekerci, *Polish J. Chem.*, 76, 907-914 (2002).
- [2] M. D. Hobday and T. D. Smith, *Coordination Chemistry Reviews*, 9 (1972-1073) 311- 337.
- [3] D.K. Johnson, T.B. Murphy, N.J. Rose, W.H. Goodwin and L. Pickart, *Inorg. Chim. Acta*, 67 (1982) 159.
- [4] L. Pickart, W.H. Goodwin, W. Burgua and D.K. Johnson, *Biochem. Pharmacol.*, 32 (1983) 3868.
- [5] Wu Zishen, Lu Zhiping and Yen Zhenhuan, *Transition Met. Chem.*, 18, 291-294 (1993).
- [6] Freshney, R.I. 2000. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th ed. John Wiley and Sons.
- [7] Wall, M.E., Taylor, H. & Wani, M. C. R. 1987. Plants antitumor agents, 24. Rapids 9-KB Assay. *J. Nat. Products*, 50 (4): 764-766.
- [8] H. Kikuzaki, N. Nakatani, *J. Food Sci.*, 1993, 1407.

Fabrikasi Sensor Elektrokimia Glukosa Termediasi Berbahan Dasar Karbon Pasta : Parameter Penting untuk Aplikasi Biosensor

Rahmat Wibowo¹⁾, R. Flora Mariana¹⁾ dan Siswati Setiasih¹⁾

1) Departemen Kimia, Universitas Indonesia
Kampus Baru UI Depok, 16424, Indonesia
e-mail: r-wibowo@ui.edu

Abstrak

Enzim glukosa oksidase digunakan pada pembuatan sensor glukosa secara elektrokimia termediasi. Elektroda enzim dikonstruksi dengan mencampurkan bubuk karbon aktif, glukosa oksidase dan *p*-benzokuinon sebagai mediator yang direkatkan oleh minyak parafin. Optimasi terhadap komposisi material tersebut dilakukan untuk mendapatkan baik karakter fisika maupun kimia yang diinginkan. Hasil pengukuran siklik voltametrinya menunjukkan bahwa elektroda enzim memiliki respon terhadap penambahan glukosa yang dapat dilihat dengan adanya peningkatan arus reaksi quasi reversibel quinon-hidroquinon dengan $E_{p,a} = \pm (+120 \text{ mV})$ dan $E_{p,c} = \pm (-36 \text{ mV})$ versus *Ag/AgCl*. Sensor glukosa ini memiliki kelinieran terhadap konsentrasi glukosa 0 – 30 mM dengan $R^2=0,9929$.

Kata kunci: biosensor; glukosa oksidase; *p*-benzokuinon; voltametri siklik

1. Pendahuluan

Penggunaan karbon pasta sebagai material pembuatan elektroda telah banyak digunakan peneliti. Hal ini dapat dimengerti karena sifatnya sebagai konduktor dan memiliki arus latar yang kecil. Kemudahan dalam fabrikasinya dengan mencampurkan senyawa organik sebagai perekat juga merupakan keuntungan lainnya. Selain itu, modifikasi dapat dengan mudah dilakukan dalam skala laboratorium melalui pencampuran agen pemodifikasi (*modifier*) seperti senyawa pengenalan (*recognition molecule*) ke dalam campuran pasta. Beberapa aplikasi elektroda karbon pasta sebagai biosensor telah dilakukan para peneliti untuk tujuan diagnostik klinis terhadap glukosa (Motta et al., 1994; Patel et al., 2003), asam urat (Santha et al., 2003), asam laktat (Molina et al., 1999) maupun hidrogen peroksida (Razola et al., 2003). Kemudahan dan aplikasinya yang luas tersebut yang mendorong peneliti untuk melakukan penelitian ini dengan pertimbangan kemampuan yang ada.

Biosensor yang diteliti dalam penelitian ini merupakan biosensor generasi kedua dimana

ko-substrat alami enzim glukosa oksidase (GOx) disubstitusi oleh mediator sintesis *p*-benzokuinon (Q) yang dalam beberapa hal memiliki keunggulan dari biosensor generasi pertama yang telah dipelajari (Wibowo et al., 2003). Teknik imobilisasi mediator dan enzim pada matriks karbon tersebut menyebabkan kedua agen yang berperan dalam rangkaian transfer elektron berada dekat (*close proximity*) dengan transduser. Keadaan ini memungkinkan respon yang dihasilkan menjadi relatif lebih singkat karena faktor-faktor yang berkaitan dengan transfer masa mediator dapat diperkecil. Hal ini berbeda dengan yang telah dilakukan sebelumnya (Wibowo et al, 2003, Situmorang et al., 2001) dengan tehnik imobilisasi secara *entrapment* ke dalam matriks polimer dimana faktor transfer substrat maupun ko-substrat mendominasi penentuan responnya.

Makalah ini merupakan hasil dari penelitian awal yang dilakukan dalam upaya mengembangkan teknologi biosensor. Penekanan pada makalah ini terletak pada penjelasan parameter penting dalam fabrikasi yang mencakup penentuan komposisi dan

fenomena yang terjadi di permukaan elektroda. Selain itu gambaran aplikasinya sebagai biosensor glukosa dijabarkan. Biosensor generasi kedua ini difabrikasi menggunakan serbuk karbon yang direkatkan dengan minyak parafin, p-benzokuinon sebagai mediator dan enzim glukosa oksidase sebagai *biorecognition molecule*.

2. Percobaan

2.1. Bahan kimia dan peralatan

Glukosa oksidase (GOx) (EC. 1.1.3.4) type II-S dari *Aspergillus niger* dan minyak parafin (*mineral oil*) diperoleh dari Sigma. Karbon aktif, p-benzokuinon (Q), D-glukosa diperoleh dari Merck dan digunakan tanpa pemurnian lebih lanjut. Beberapa reagen lain untuk pembuatan elektrolit (KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan KCl) diperoleh dari Merck dengan tingkat kemurnian tinggi (*analytical grade*). Larutan elektrolit bufer fosfat pH 7,0 diatur dengan menambahkan larutan encer NaOH atau HCl menggunakan Orion pH meter. Larutan stok glukosa dibiarkan bermutarotasi selama 24 jam pada temperatur 4 °C sebelum digunakan. Pengukuran elektrokimia dilakukan menggunakan potensiostat (Versastat™ Model 270/250 dari Perkin Elmer) yang dihubungkan dengan personal komputer.

2.2. Pembuatan elektroda karbon pasta

Elektroda kerja yang digunakan pada percobaan ini berbahan dasar karbon pasta. Sebelum digunakan, serbuk karbon dipanaskan pada temperatur 70 °C selama 2 jam untuk menghilangkan molekul yang terserap dan mengaktifkan permukaannya. Selanjutnya pasta dibuat dengan mencampurkan karbon aktif tersebut dengan minyak parafin dengan komposisi yang divariasikan ke dalam sebuah alat penghalus. Pasta yang telah terbentuk

dimasukkan secara manual ke dalam tabung gelas ($\varnothing = 2 \text{ mm}$) yang dihubungkan dengan kawat tembaga untuk kontak elektriknya dan dipoles permukaannya dengan kertas silikon karbida hingga didapatkan permukaan yang halus (mengkilat). Sedangkan elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dibuat seperti di atas dengan menambahkan mediator (Q) dan enzim (GOx) dengan komposisi yang divariasikan.

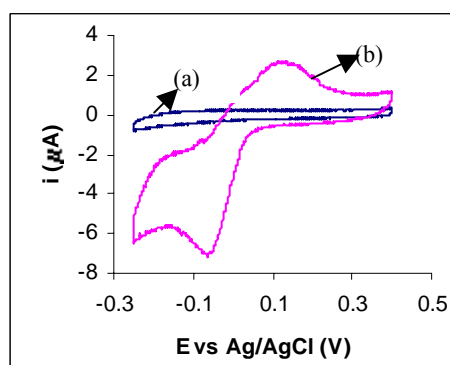
2.3. Pengukuran elektrokimia

Pengukuran elektrokimia (voltametri siklik) dilakukan dengan menggunakan konfigurasi 3 elektroda dengan elektroda karbon pasta modifikasi sebagai elektroda kerja, elektroda lembaran platina (*flag*) sebagai elektroda *counter* dan Ag/AgCl sebagai elektroda pembanding yang dihubungkan dengan sebuah potensiostat. Pengukuran dilakukan di bawah kondisi atmosfer nitrogen (N_2)

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Komposisi material elektroda

Percobaan pendahuluan pembuatan karbon pasta dilakukan dengan memvariasikan sejumlah tertentu karbon aktif dan mineral oil. Hal ini umum dilakukan pada pembuatan elektroda berbasis karbon. Yang menjadi acuan pada eksperimen ini adalah diperolehnya kondisi fisik elektroda (kekuatan/kerapuhan) dan hambatannya. Dari hasil percobaan yang dilakukan diperoleh komposisi optimum 65% karbon dan 35% minyak parafin. Komposisi ini memberikan nilai hambatan yang relatif lebih kecil (74Ω) dengan karakteristik fisik kualitatif yang kuat berada di dalam tabung gelas selang waktu penggunaannya. Peningkatan minyak parafin sebesar 5% meningkatkan nilai hambatan menjadi 120Ω . Sedangkan komposisi minyak parafin 5% di bawah komposisi optimum tidak cukup efektif

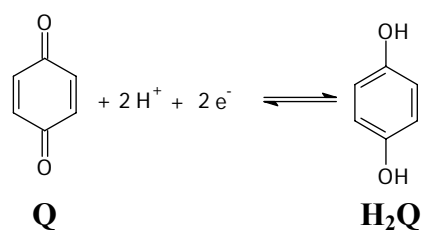


Gambar 1. Kurva CV elektroda karbon pasta tanpa (a) dan dengan mediator Q (b) pada larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 dengan scan rate 50 mV/s dalam atmosfer N_2

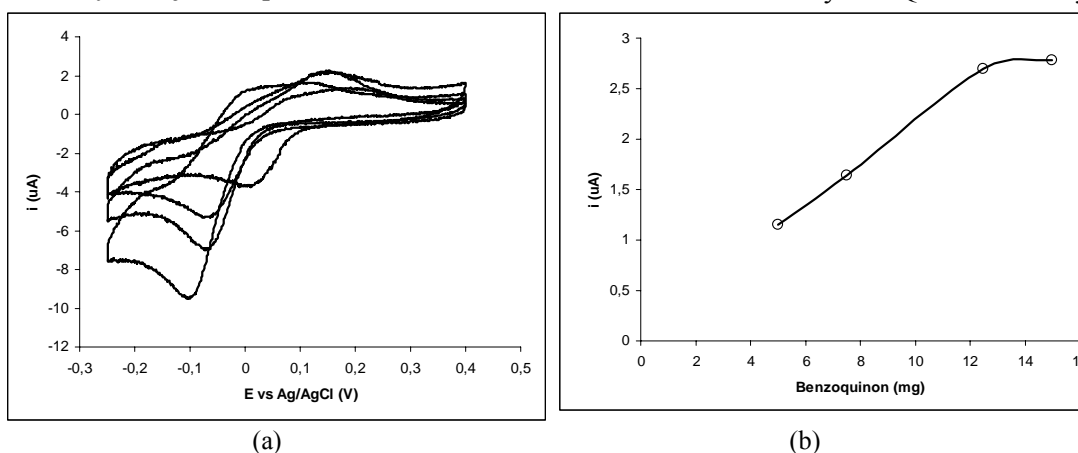
merekatkan serbuk karbon (pengamatan visual kualitatif) walaupun memberikan nilai hambatan yang relatif lebih kecil.

Tahapan selanjutnya adalah pembuatan elektroda modifikasi. Modifikasi dilakukan terlebih dahulu dengan menggunakan mediator sintetik p-benzokuinon (Q). Pada aplikasinya sebagai biosensor, Q berperan sebagai ko-substrat atau mediator yang berfungsi dalam rangkaian transfer elektron dari pusat aktif GOx ke elektroda. Peran Q tersebut pada proses bioelektrokatalitik sangat menentukan respon elektroda yang difabrikasi. Variasi jumlah Q dilakukan pada komposisi optimum pembuatan karbon pasta seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Gambar 1. memperlihatkan kurva CV dari elektroda karbon pasta yang tidak (a) dan yang mengandung mediator Q (b). Dari kurva tersebut dapat dilihat bahwa minyak parafin bukan merupakan spesies elektroaktif yang dapat dibuktikan dengan tidak terdapatnya proses faradaik dari elektroda yang digunakan pada rentang potensial yang diberikan. Dengan kata lain minyak parafin tidak mengganggu pengukuran respon elektroda tersebut. Dalam hal ini, minyak parafin hanya berfungsi sebagai perekat material karbon dan pengontrol porositas elektroda yang dihasilkan. Salah satu keuntungan lainnya adalah sifatnya yang hidrofobik menghindari difusi larutan elektrolit ke dalam badan elektroda dan menjaga daerah kontak dengan elektrolit tetap dipermukaannya (Kulys, 1999). Hal ini menjadi sangat penting untuk menjaga reaksi elektrokatalitik benar-benar hanya terjadi dipermukaan elektroda.

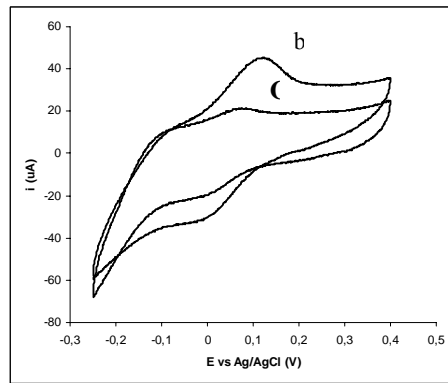
Modifikasi dengan penambahan sejumlah Q yang merupakan spesies elektroaktif memiliki kurva CV yang berbeda sangat signifikan. Dari kurva CV elektroda yang mengandung Q terlihat adanya proses faradaik yang terjadi dengan diamatinya puncak arus anoda ($E_{p,a} = \pm (+120 \text{ mV})$) dan dan katoda ($E_{p,c} = = \pm (-36 \text{ mV})$) versus Ag/AgCl. Harga perbedaan potensial anoda-katoda ($\Delta E_p > 58 \text{ mV}$) menandakan reaksi redoks Q/H₂Q di bawah ini merupakan reaksi yang quasireversibel.



Jumlah mediator pada badan elektroda, merupakan parameter penting yang diperhitungkan karena fungsinya untuk mengaktifkan kembali enzim GOx (*turn over*). Gambar 2. (a). merupakan kurva voltamogram siklik (CV) dari elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan Q yang bervariasi. Dari kurva CV tersebut dapat diamati bahwa sesuai dengan persamaan Ilkovic, penambahan jumlah Q meningkatkan tinggi puncak arus. Hal ini dapat diamati pada penggunaan 5 mg, 7,5 mg dan 12,5 mg Q (Gambar 2. (b)). Peningkatan Q selanjutnya tidak berpengaruh besar terhadap tinggi puncak arus anoda (i_{pa}). Hal ini disebabkan karena terjadinya polimerisasi Q. Polimerisasi yang terjadi di badan elektroda akibat bertambahnya Q inilah yang



Gambar 2. (a) Kurva siklik voltamogram elektroda karbon pasta yang dimodifikasi oleh Q dalam larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 pada scan rate 50 mV/s pada atmosfer N₂. (b) Plot tinggi puncak arus anoda terhadap Q yang digunakan



Gambar 3. Kurva siklik voltamogram elektroda karbon pasta yang dimodifikasi oleh Q dan GOx dalam larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 pada scan rate 50 mV/s pada atmosfer N₂ tanpa (a) dan dengan (b) kandungan glukosa 0,1M

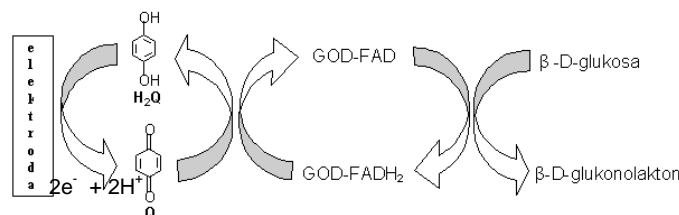
menyebabkan terdistorsinya tinggi puncak arus anoda, sehingga arus anoda mengalami kejenuhan (*saturated current*). Fenomena penting lain yang diamati adalah peningkatan Q meningkatkan juga *residual current* yang dihasilkan, karena semakin banyak gugus fungsi keton terprotonasi selama pemberian muatan (*charging*) akan menarik ion bermuatan berbeda ke permukaan elektroda. Hal ini menyebabkan permukaan elektroda dan larutan yang membentuk suatu kapasitor akan mampu menampung ion bermuatan lebih banyak lagi (Mariana, 2004). Berdasarkan hasil percobaan ini, ditentukan komposisi optimum karbon, minyak parafin dan Q berturut-turut sebesar 57,01%; 40,15% dan 2,85%

3.2. Modifikasi elektroda karbon pasta dengan glukosa oksidase (GOx)

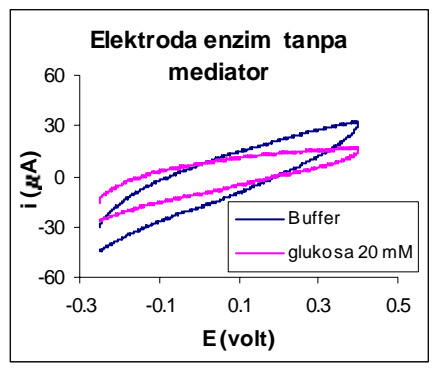
Untuk keperluan analitis sebagai biosensor, elektroda karbon pasta dimodifikasi dengan enzim GOx. Gambar 3. merupakan kurva CV dari elektroda yang dimodifikasi dengan enzim GOx dalam larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 tanpa (a) dan dengan kandungan glukosa 0,1 M (b). Terlihat bahwa walaupun di uji dalam larutan tanpa kandungan glukosa, pada kurva CV-nya tampak adanya puncak arus anoda dan

katoda yang menandakan proses redoks Q/H₂Q tetap berlangsung. Pada penambahan glukosa 0,1 M ke dalam larutan uji, terlihat peningkatan arus yang sangat signifikan yaitu naik lebih dari 2 kali lipat. Ini menandakan bahwa reaksi elektrokatalitik terjadi di permukaan elektroda karbon pasta modifikasi. Skema rangkaian transfer elektron pada proses elektrokatalitik yang terjadi di permukaan elektroda tersebut digambarkan dalam Gambar 4.

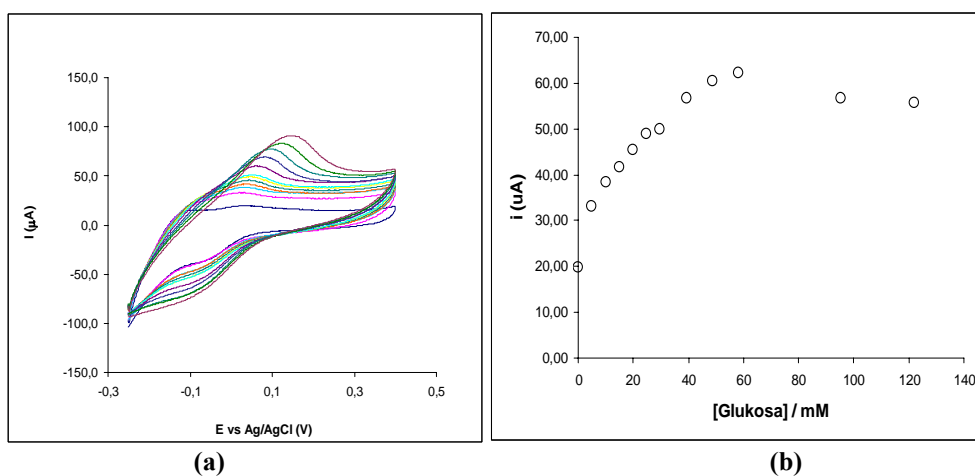
Eksperimen kontrol untuk mengetahui peran mediator Q dalam proses elektrokatalitik elektroda modifikasi tersebut dilakukan dengan melakukan voltametri siklik terhadap elektroda yang dimodifikasi hanya dengan enzim GOx tanpa adanya mediator dalam larutan yang mengandung konsentrasi glukosa 20 mM. Hasil eksperimen kontrol tersebut dapat dilihat pada Gambar 5. yang menunjukkan bahwa proses faradaik tidak terjadi pada rentang potensial yang diberikan. Pusat aktif enzim GOx-falvin adenin dinukleotida(FAD)- merupakan spesies elektroaktif. Walaupun demikian proses faradaik yang melibatkan proses redoks FAD/FADH₂ tidak teramati. Hal ini dapat dimengerti bahwa pusat aktif tersebut terisolasi (terselubungi) oleh protein sehingga tidak ada



Gambar 4. Skema rangkaian transfer elektron pada proses elektrokatalitik β -D-glukosa di permukaan elektroda karbon pasta yang dimodifikasi oleh Q dan GOx



Gambar 5. Kurva CV elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan GOx tanpa mediator dalam larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung glukosa 0,1 M dengan scan rate 50 mV/s pada atmosfer N₂.



Gambar 6 (a) Kurva voltamogram siklik sebagai fungsi konsentrasi glukosa berturut-turut 0; 4,98; 9,90; 14,78; 19,61; 24,69; 29,56; 39,32; 48,78; 58,25; 95,24; 122,01 mM. (b) kurva kalibrasi respon i terhadap konsentrasi glukosa

kontak langsung dengan permukaan elektroda.

3.3. Aplikasi sebagai biosensor glukosa

Untuk mengetahui kemampuan elektroda modifikasi tersebut memiliki respon yang baik pada aplikasinya sebagai biosensor, eksperimen voltametri siklik dilakukan dengan menambahkan larutan stok glukosa secara bertahap ke dalam sel elektrokimia. Gambar 6(a). menunjukkan hasil yang diperoleh dari pengukuran tersebut. Dari kurva tersebut dapat dilihat bahwa respon yang diberikan semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi glukosa dalam larutan. Sedangkan Gambar 6(b). Merupakan kurva kalibrasi arus respon (i) terhadap konsentrasi glukosa. Terlihat bahwa pada peningkatan konsentrasi glukosa sampai sekitar 30 mM masih memberikan peningkatan respon yang linier. Peningkatan konsentrasi glukosa selanjutnya tidak berpengaruh terhadap peningkatan arus (keadaan *saturated*). Perubahan respon yang dihasilkan sebagai akibat

dari perubahan kontrol kinetik (pada kisaran konsentrasi rendah) menjadi reaksi yang dikontrol oleh transfer massa (pada kisaran konsentrasi lebih tinggi) (Gross et. al, 1995). Dari Gambar 6(b). dapat pula dikalkulasi hubungan respon terhadap konsentrasi yang memberikan nilai koefisien kelinieran mencapai 0,9929 dengan *dynamic range* sekitar 60 mM glukosa .

4. Kesimpulan

Elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan mediator benzokuinon dan enzim glukosa oksidase telah berhasil difabrikasi secara sederhana di laboratorium. Penentuan komposisi materail penyusun elektroda tersebut merupakan parameter penting diperolehnya elektroda dengan kondisi fisik yang mendukung aplikasinya sebagai biosensor elektrokimia. Hasil pengujian dengan teknik voltametri siklik menunjukkan bahwa elektroda tersebut cukup responsif terhadap penambahan

glukosa dalam larutan. Kisaran kerja (*dynamic range*) elektroda sampai pada konsentrasi glukosa sekitar 60 mM dengan kelinieran berada pada kisaran 5-30 mM dimana pengukuran kadar gula darah manusia mungkin dilakukan. Penelitian ini memberikan implikasi bahwa dengan material yang sederhana, kemampuan lokal dalam hal rancang bangun biosensor dapat dilakukan dan ditingkatkan.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Kimia atas Hibah Starter Penelitian yang diberikan untuk melaksanakan penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

Gros, P., Bergel A., (1995), Improved model of polypyrrole glucose-oxidase modified electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **399** (1-2), 107-107.

Kulys, J., (1999), The carbon paste electrode encrusted with a microreactor as glucose biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 473-479.

Mariana, F.R., (2005), *Sensor glukosa secara voltametri siklik dengan menggunakan elektroda karbon pasta yang dimodifikasi dengan glukosa oksidase dan p-benzokuinon*, Skripsi S-1, Departemen Kimia, Universitas Indonesia.

Molina, C.R., Boutjita M., El Murr N., (1999), A carbon paste electrode modified by entrapped toluidine blue-O for amperometric determination of

L-lactate, *Analytica Chimica Acta*, **401** (1-2), 155-162.

Motta, N., Ana R.G., (1994), Activated carbon paste electrodes for biosensors, *Analytical Chemistry*, **66**(4), 566-571.

Petel, H., Li X., Karan HI., (2003). Amperometric glucose sensors based on ferrocene containing polymeric electron transfer systems-a preliminary report, *Biosensors & Bioelectronics*, **18** (8), 1073-1076.

Razola, S.S., Blankert B., Quarin G., Kauffman JM., (2003). Phenothiazine drugs as mediators in horseradish peroxidase bioelectrocatalysis, *Analytical Letters*, **36**(9), 1819-1833.

Santha, H., Dobay R., Harsani G., (2003). Amperometric uric acid biosensors fabricated of various types of uricase enzymes, *IEEE Sensors Journal*, **3**(3), 282-287.

Situmorang, M., Gooding J. J., Hibbert D. B., Barnett D., (2002), The development of a pyruvate biosensor using electrodeposited polytyramin, *Electroanalysis*, **14** (1) 17-21.

Wibowo, R., (2003), *Novel approaches for enzyme immobilization using latex polymers or carbon nanotubes: Application to enzyme biosensors*, Master thesis: The University of New South Wales, Australia.

Wibowo, R., Joshua F., David B.H., Robert G. G., John J. G., (2003), Using the aggregation of latex polymers in the fabrication of reproducible enzyme electrodes, *Electroanalysis*, **15**(17), 1364-1368.

Senyawa Stilbenoid dan Flavonoid dari *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr.

Rani Maharani¹⁾, Euis H. Hakim¹⁾, Yana M. Syah¹⁾, Lukman Makmur¹⁾, Lia D. Juliawaty¹⁾,
Sjamsul A. Achmad¹⁾, Ikram M. Said,²⁾ Laily B. Din²⁾, Jalifah Latip²⁾

¹⁾Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia

²⁾School of Chemical Sciences & Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E., Malaysia

Abstrak

Satu senyawa stilbenoid, *trans-4-isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben (1)*, dan tiga senyawa flavonoid, *artokarpanon (2)*, *kudraflavon C (3)*, dan *artokarpin (4)*, telah diisolasi dari ekstrak metanol kayu akar *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr. Struktur senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ¹H NMR dan ¹³C NMR, serta melalui perbandingan langsung dengan data senyawa yang sama yang telah dilaporkan.

Kata kunci: *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr., *artokarpin*, *artokarpanon*, *kudraflavon C*, *trans-4-isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben*

1. Pendahuluan

Artocarpus yang dikenal dengan nangkakan adalah genus utama ketiga dalam famili Moraceae, memiliki kurang lebih 60 spesies yang tumbuh di kawasan Asia tenggara dan Malesia yang meliputi Indonesia, Malaysia, Singapura, Brunei, Filipina, dan Papua New Guinea (Zerega, 2004). Tumbuhan *Artocarpus* dimanfaatkan masyarakat sebagai bahan pangan, bahan bangunan, dan obat tradisional, antara lain sebagai obat malaria, disentri, dan penyakit kulit (Heyne, 1987). Penggunaan tersebut tentunya tidak terlepas dari bahan-bahan kimia yang dikandungnya sehingga spesies *Artocarpus* termasuk tanaman Moraceae yang banyak menarik perhatian para peneliti.

Secara fitokimia tumbuhan dari genus ini merupakan sumber senyawa flavonoid terprenilasi. Beberapa senyawa yang telah berhasil diisolasi diantaranya, siklocampedol (Achmad, 1996), artokarpin, heteroflavanon-A (Hakim, 1998), artoindonesianin A dan B (Hakim, 1999), dan artoindonesianin Q-T (Syah, 2002). Selain itu, senyawa-senyawa terpenoid dari jenis triterpena seperti

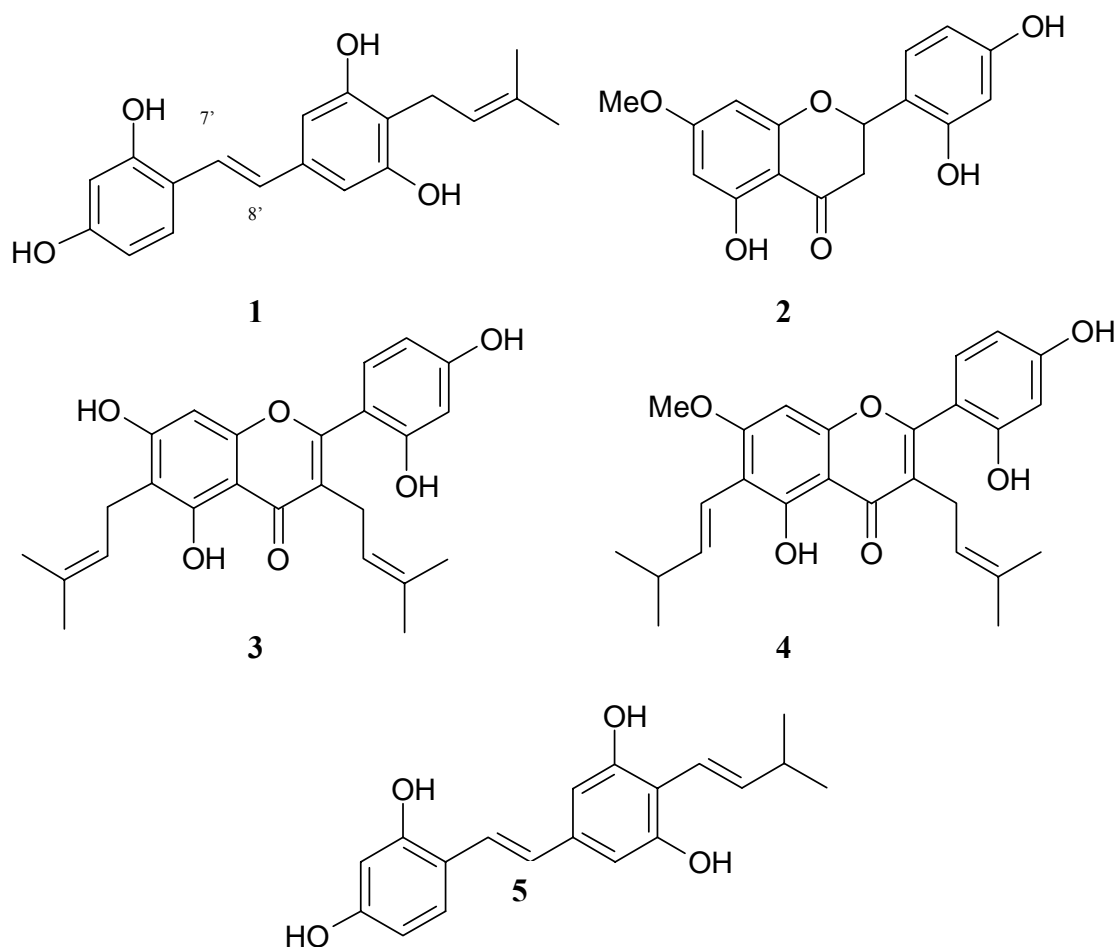
sikloeukalenol, glutinol, sikloartenon, dan 2,4-metilensikloartenon, serta suatu sterol, β -sitosterol juga telah ditemukan dari tumbuhan *Artocarpus* (Achmad, 1997).

Berdasarkan studi aktivitas biologi, diketahui bahwa beberapa senyawa yang diisolasi dari *Artocarpus* memiliki aktivitas biologi yang meliputi anti inflamasi, sitotoksik, anti malaria, dan inhibitor beberapa enzim (Kundu, 1989; Boonlaksiri, 2000; Likhitwitayawuid, 2001; Lu, 2003).

Pada kesempatan ini akan dilaporkan mengenai penemuan senyawa *trans-4-isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben (1)*, suatu senyawa stilben terprenilasi, artokarpanon (2), suatu senyawa turunan flavanon, kudraflavon C (3), dan artokarpin (4), suatu senyawa flavon terprenilasi, dari ekstrak metanol kayu akar *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr. Struktur keempat senyawa tersebut telah ditetapkan berdasarkan analisis spektroskopi UV, IR, ¹H NMR dan ¹³C NMR.

2. Percobaan

Umum. Pada percobaan ini data fisik titik leleh ditentukan dengan menggunakan alat



penetapan titik leleh mikro Fisher-John. Spektrum UV dan IR diukur masing-masing dengan spektrofotometer Varian Cary 100 Conc. dan ONE Perkin Elmer. Spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR diukur menggunakan spektrofotometer JEOL ECP400 yang bekerja pada 400,0 MHz (^1H) dan 100,0 MHz (^{13}C). Kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan menggunakan Si gel Merck 60 GF₂₅₄, kromatografi radial menggunakan Si gel Merck PF₂₅₄, kromatografi tekan dengan Si gel Merck 60 (400 mesh), analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada pelat aluminium berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan adalah yang berkualitas teknis yang didestilasi. Larutan 1,5% Ce(SO₄)₂ dalam 2N H₂SO₄ digunakan sebagai pereaksi penampak noda.

Pengumpulan bahan tumbuhan. Bahan tumbuhan berupa kayu akar *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr. dikumpulkan pada bulan Juli 2004 dari Kampung Sawah, Depok. Spesies ini diidentifikasi oleh Herbarium Bogoriense, Pusat penelitian dan Pengembangan Biologi,

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor, dan spesimennya tersimpan di herbarium tersebut.

Ekstraksi dan isolasi. Kayu akar yang telah dikeringkan dan digiling (2,3 kg) dimaserasi dengan metanol (9 l). Setelah pelarut diuapkan pada tekanan rendah, diperoleh ekstrak metanol berupa residu berwarna coklat tua (100 g). Ekstrak metanol tersebut kemudian difraksinasi dengan teknik kromatografi KCV menggunakan berturut-turut eluen heksana, campuran heksana-etil asetat, etil asetat, campuran etil asetat-metanol, dan metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan. Fraksi-fraksi yang diperoleh digabungkan berdasarkan analisis KLT, menghasilkan tujuh fraksi utama (A-G). Fraksi F dan G masing-masing difraksinasi lebih lanjut dengan teknik KCV menggunakan eluen heksana, campuran heksana-etil asetat, etil asetat, dan campuran etil asetat-metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan menghasilkan masing-masing lima fraksi gabungan (F1-F5) dan enam fraksi gabungan (G1-G6). Gabungan fraksi F1-

F2-G1 (F1) difraksinasi lebih lanjut dengan teknik KCV menggunakan eluen heksana, campuran heksana-etil asetat, etil asetat, dan campuran etil asetat-metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan menghasilkan lima fraksi gabungan (F11-F15). Fraksi F13 dipisahkan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial menggunakan eluen campuran kloroform-heksana-metanol (9:1:0,5) menghasilkan senyawa **1**. Fraksi E (1,2 g) difraksinasi lebih lanjut dengan teknik KCV menggunakan eluen heksana, campuran heksana-etil asetat, etil asetat, dan campuran etil asetat-metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan menghasilkan empat fraksi gabungan (E1-E4). Fraksi E4 dipisahkan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial menggunakan eluen campuran kloroform-etil asetat (9,5:0,5) menghasilkan delapan fraksi gabungan (E41-E48). Fraksi E46 dipisahkan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial menggunakan eluen kloroform (100%) menghasilkan senyawa **2**. Sedangkan fraksi E3 dipisahkan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial dengan eluen kloroform (100%) menghasilkan senyawa **3**. Fraksi D (1,3 g) difraksinasi lebih lanjut dengan teknik KCV menggunakan eluen heksana, campuran heksana-etil asetat, etil asetat, dan campuran etil asetat-metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan, menghasilkan empat fraksi gabungan (D1-D4). Fraksi D4 kemudian dikristalisasi dengan campuran heksana-etil asetat menghasilkan senyawa **4** (200 mg).

trans-4-Isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidrosistilben (**1**), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna cokelat muda, t.l. 200-202°C; UV (MeOH) λ_{maks} (nm): 216, 292, 303, dan 328; (MeOH + NaOH) λ_{maks} (nm): 205, 247, 292, dan 346; IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3291 (OH), 2963, 2925 (C-H alifatik), 1613, 1599, 1509, 1451, 1429 (C=C), 1281, 1159 (C-O), dan 855 (benzena tersubstitusi para); ^1H NMR (aseton- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 6,55 (2H, s, H-2;H-6), 6,41 (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-3'), 6,35 (1H, dd, $J=2,2;8,4$ Hz, H-5'), 7,34 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-6'), 7,24 (1H, d, $J=16,4$ Hz, H-7'), 6,79 (1H, d, $J=16,4$ Hz, H-8'), 3,32 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H-1''), 5,30 (1H, t, $J=8,0$ Hz, H-2''), 1,61 (1H, s, H-4''), 1,74 (1H, s, H-5''), 8,18 (2H, s, OH-3;5), 8,50 (1H, s, OH-2'), dan 8,69 (1H, s, OH-4').

Artokarpanon (**2**), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna putih kekuningan, t.l. 208-210°C; UV (MeOH) λ_{maks} (nm): 202, 229 (bh), 286 dan 334; (MeOH + NaOH) λ_{maks} (nm): 205, 286, dan 443; IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3405, 3215 (OH), 2919 (C-H alifatik), 1640 (C=O), 1605, 1502, 1455, 1355 (C=C aromatik), 1157 (C-O), dan 831 (benzena tersubstitusi para); ^1H NMR (aseton- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 5,73 (1H, dd, $J=2,9;13,0$ Hz, H-2), 3,21 (1H, dd, $J=13,0;17,0$ Hz, H-3ax), 2,74 (1H, dd, $J=2,9;17,2$ Hz, H-3eq), 6,47 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H-3'), 6,43 (1H, dd, $J=2,2;8,4$ Hz, H-5'), 7,32 (1H, d, $J=8,4$ Hz, H-6'), 6,05 (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-6), 6,02 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H-8), 3,84 (3H, s, -OMe), dan 8,50;12,17 (OH); ^{13}C NMR (aseton- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 75,4, 42,6, 198,1, 159,5, 94,4, 168,7, 95,3, 164,6, 103,7, 117,3, 156,3, 103,4, 165,0, 107,9, 129,0, dan 56,1.

Kudraflavon C (**3**), diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning jingga, t.l. 97-100°C; UV (MeOH) λ_{maks} (nm): 203, 264, dan 322 (bh); (MeOH + NaOH) λ_{maks} (nm): 205, 269, dan 359; IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3382 (OH), 2963, 2924 (C-H alifatik), 1649 (C=O), 1620, 1562, 1464, 1359 (C=C aromatik), dan 815 (benzena tersubstitusi para); ^1H NMR (aseton- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 6,38 (1H, s, H-8), 3,08 (2H, d, $J=6,9$ Hz, H-9), 5,10 (1H, m, H-10), 1,41 (3H, s, H-12), 1,55 (3H, s, H-13), 3,33 (2H, d, $J=6,9$ Hz, H-14), 5,25 (1H, m, H-15), 1,75 (3H, s, H-17), 1,62 (3H, s, H-18), 6,53 (1H, d, $J=2,2$ Hz, H-3'), 6,48 (1H, dd, $J=8,4;2,2$ Hz, H-5'), dan 7,14 (1H, d, $J=8,4$, H-6'); ^{13}C NMR (aseton- d_6 , 100 MHz) δ (ppm): 162,1, 121,4, 182,9, 104,9, 159,9, 111,7, 162,4, 93,4, 157,0, 24,5, 122,7, 131,9, 25,8, 17,8, 21,9, 123,3, 131,3, 25,7, 17,6, 112,9, 157,2, 103,7, 161,4, 107,9, dan 132,1.

Artokarpin (**4**), diperoleh sebagai jarum berwarna kuning pucat, t.l. 174-177°C; UV (MeOH) λ_{maks} (nm): 203, 279, dan 320 (bh); (MeOH + NaOH) λ_{maks} (nm): 205, 277, dan 347; IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3393 (OH), 2959, 2927, 2862 (C-H alifatik), 1621 (C=O), 1621, 1479, 1452, 1352 (C=C aromatik), 1206 (C-O), dan 847 (benzena tersubstitusi para).

3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa **1** diperoleh sebagai padatan amorf berwarna putih kecokelatan dengan titik leleh 200-202°C. Spektrum UV dalam metanol

Tabel 1. Perbandingan data NMR senyawa 1 dan 5

No. H	¹ H NMR (δ_H (integrasi, <i>multipl.</i> , <i>J</i> dalam Hz))	
	Senyawa 1 (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 5 (DMSO- <i>d</i> ₆)
2 & 6	6,55 (2H, s)	6,44 (2H, s)
3'	6,41 (1H, d, <i>J</i> =2,2)	6,31 (1H, d, <i>J</i> =2,3)
5'	6,35 (1H, dd, <i>J</i> =2,2 ; 8,4)	6,24 (1H, dd, <i>J</i> =2,3; 8,5)
6'	7,34 (1H, d, <i>J</i> =8,4)	7,35 (1H, d, <i>J</i> =8,5)
7'	7,24 (1H, d, <i>J</i> =16,4)	7,13 (1H, d, <i>J</i> =16,4)
8'	6,79 (1H, d, <i>J</i> =16,4)	6,70 (1H, d, <i>J</i> =16,4)
1''	3,32 (2H, d, <i>J</i> =8,0)	6,51 (1H, d, <i>J</i> =16,2)
2''	5,3 (1H, t, <i>J</i> = 8,0)	6,58 (1H, dd, <i>J</i> =6,3 ; 16,2)
3''	-	2,38 (1H, m)
4''	1,61 (3H, s)	} 1,03 (6H, d, <i>J</i> =6,7 Hz)
5''	1,74 (3H, s)	

* *trans*-(3-metil-*E*-but-1-enil)-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben (Boonlaksiri, 2000)

Tabel 2. Perbandingan data NMR senyawa 2 dan literatur

No. C	¹ H NMR [δ_H (integrasi, <i>multipl.</i> , <i>J</i> dalam Hz)]		¹³ C NMR (δ_C)	
	Senyawa 2 (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 2* (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 2 (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 2* (aseton- <i>d</i> ₆)
2	5,73 (1H, dd, <i>J</i> =2,9;13,0)	5,75 (1H, dd, <i>J</i> =3,0;13)	75,4	75,9
3	H-ax = 3,21 (1H, dd, <i>J</i> =13,0;17,0) H-eq = 2,74 (1H, dd, <i>J</i> =2,9; 17,2)	H-ax = 3,21 (1H, dd, <i>J</i> =13,0;17,0) H-eq = 2,76 (1H, dd, <i>J</i> =3,0;17,0)	42,6	43,0
4	-	-	198,1	198,5
5	-	-	159,5	160,0
6	6,05 (1H, d, <i>J</i> =1,0)	6,06	94,4	94,8
7	-	-	168,7	169,1
8	6,02 (1H, d, <i>J</i> =2,5)	6,03	95,3	95,7
9	-	-	164,6	165,1
10	-	-	103,7	104,1
1'	-	-	117,3	117,1
2'	-	-	156,3	156,7
3'	6,47 (1H, d, <i>J</i> =2,5)	6,52 (1H, d, <i>J</i> =2,2)	103,4	103,9
4'	-	-	165,0	165,4
5'	6,43 (1H, dd, <i>J</i> =2,5;8,4)	6,54 (1H, dd, <i>J</i> =2,2;8,0)	107,9	108,3
6'	7,32 (1H, d, <i>J</i> =8,4)	7,42 (1H, d, <i>J</i> =8,0)	129,0	129,4
-OMe	3,84 (3H, s)	3,77;3,85	56,1	56,6
-OH	8,50;12,17	8,82;12,16	-	-

*Artokarpanon (Lu, 1995)

memberikan serapan pada panjang gelombang 216, 292, 303, dan 328 nm yang khas untuk senyawa golongan stilben. Penambahan reagen geser NaOH menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 43 nm yang menunjukkan adanya gugus OH bebas. Dugaan adanya stilben didukung oleh analisis spektrum IR yang menunjukkan adanya pita-pita serapan untuk gugus C=C aromatik (1613, 1599, 1509, 1451, dan 1429 cm⁻¹), benzena tersubstitusi para

(855 cm⁻¹), -OH (3291 cm⁻¹), dan C-O (1281, 1159 cm⁻¹). Adanya pita serapan untuk gugus -CH alifatik pada 2963, dan 2925 cm⁻¹ mengarahkan pada dugaan adanya gugus isoprenil pada kerangka stilben tersebut. Spektrum ¹H NMR menunjukkan adanya ikatan rangkap *trans* disubstitusi terhadap dua karbon kuarternar dengan munculnya dua proton olefinik doublet (δ_H 7,24, d, *J*=16,4 Hz dan δ_H 6,79, d, *J*=16,4 Hz), Adanya dua buah proton

ekuivalen dengan multiplisitas singlet menunjukkan adanya pola trisubstitusi pada cincin A pada posisi 3, 4, dan 5 (δ_H 6,55, s). Tiga proton aromatik pada cincin B menunjukkan adanya sistem ABX yang sangat jelas (δ_H 6,41, d, $J=2,2$ Hz; 6,35, dd, $J=2,2;8,4$ Hz; 7,34, d, $J=8,4$ Hz) yang merupakan tipe substitusi pada posisi 2' dan 4' dari cincin B. Geseran kimia yang menunjukkan adanya bagian isoprenil adalah pada δ_H 3,32 (2H, d, $J=8,0$ Hz, H-1''), 5,30 (1H, t, $J=8,0$ Hz, H-2''), 1,61 (3H, s, H-4''), dan 1,74 (3H, s, H-5''). Dari analisis spektrum 1H NMR tersebut, maka dapat disarankan bahwa senyawa **1** adalah *trans*-4-isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben. Bukti tambahan spektrum 1H dan ^{13}C NMR yang menunjang struktur senyawa **1** adalah dengan membandingkan data spektrum 1H dan ^{13}C NMR dengan data spektrum dari senyawa **5** yang telah dilaporkan dengan perbedaan hanya pada bagian prenilnya. sebagaimana dinyatakan pada Tabel 1.

Senyawa **2** diperoleh sebagai padatan amorf berwarna putih kekuningan dengan titik leleh 208-210°C. Spektrum UV dalam metanol memberikan serapan pada panjang gelombang 202, 229 (bh), 286, dan 334 nm yang khas untuk golongan flavonoid flavanon. Dimana muncul pita I pada daerah antara 300-350 nm dan pita II pada daerah antara 275-295 nm. Adanya pergeseran batokromik sebesar 109 nm pada pita I dengan penambahan reagen geser NaOH mengindikasikan adanya gugus -OH bebas pada C-4' pada cincin B. Spektrum IR mendukung dugaan adanya kerangka flavanon untuk senyawa **2** ini dengan munculnya pita-pita serapan untuk gugus -OH (3405, 3215 cm^{-1}), C-H alifatik (2919 cm^{-1}), C=O (1640 cm^{-1}), C=C aromatik (1605, 1502, 1455, 1355 cm^{-1}), C-O (1157 cm^{-1}), dan benzena tersubstitusi para (831 cm^{-1}). Spektrum 1H NMR senyawa **2** memperlihatkan integrasi untuk 11 proton. Dimana muncul tiga sinyal proton yang menunjukkan sistem ABX untuk proton H-2 (δ_H 5,73, dd, $J=2,9;13,0$ Hz), H-3ax (δ_H 3,21, dd, $J=13,0;17,0$ Hz), dan H-3eq (δ_H 2,74, dd, $J=2,9;17,2$ Hz) dari suatu kerangka flavanon. Konstanta kopling antara proton H-2 dan H-3ax sebesar 13,0 Hz menunjukkan bahwa cincin B menempati kedudukan ekuatorial yang berarti bahwa stereokimia relatif senyawa ini sama

seperti lazimnya ditemukan pada senyawa-senyawa turunan flavanon. Adanya sinyal tiga proton dengan multiplisitas singlet menunjukkan adanya gugus -OCH₃ pada C-7 (δ_H 3,84, s). Selain itu, spektrum 1H NMR senyawa **2** juga memperlihatkan adanya dua sinyal proton untuk dua proton aromatik yang berorientasi meta pada cincin A, masing-masing untuk H-6 (δ_H 6,05, d, $J=2,2$ Hz) dan H-8 (δ_H 6,02, d, $J=2,2$ Hz), juga muncul sinyal proton aromatik lainnya masing-masing untuk H-3' (δ_H 6,47, d, $J=2,5$ Hz), H-5' (δ_H 6,43, dd, $J=2,5;8,4$ Hz), dan H-6' (δ_H 7,32, d, $J=8,4$ Hz) yang sesuai untuk cincin B yang teroksidasi pada posisi 2' dan 4' untuk senyawa-senyawa turunan flavanon. Dari analisis spektrum 1H NMR tersebut, maka dapat disarankan bahwa senyawa **2** adalah 2', 4', 5-trihidroksi-7-metoksiflavanon atau artokarpanon. Bukti lain yang menunjang analisis tersebut adalah dari spektrum ^{13}C NMR yang menunjukkan adanya 16 sinyal karbon yaitu, satu sinyal dari gugus -OCH₃ (δ_C 56,1), satu sinyal metilen (δ_C 42,6), empat sinyal metin berupa satu sinyal CH alifatik (δ_C 75,4) dan lima sinyal CH aromatik (δ_C 94,4, 95,3, 103,4, 107,9, dan 129,0). Sisa delapan atom karbon berupa sinyal karbon C-kuarterner yang lima diantaranya teroksidasi (δ_C 156,3, 159,5, 165,0 (2C), dan 168,7), dan satu karbonil (δ_C 198,1). Bukti tambahan spektrum 1H dan ^{13}C NMR yang menunjang struktur senyawa **2** adalah dengan membandingkan data spektrum 1H dan ^{13}C NMR dengan data yang sama dari artokarpanon yang telah dilaporkan sebagaimana dinyatakan pada Tabel 2.

Senyawa **3** diperoleh sebagai padatan amorf berwarna kuning jingga dengan titik leleh 97-100°C. Spektrum UV dalam methanol memberikan dua buah puncak serapan maksimum pada λ_{maks} 322 (bahu) (pita I) dan 264 (pita II) nm yang merupakan puncak serapan dari sistem benzoil dan sinamoil. Puncak serapan untuk sistem kromofor sinamoil (pita I) umumnya berada pada rentang panjang gelombang 320-380 nm dan puncak serapan untuk sistem kromofor benzoil (pita II) berada pada rentang panjang gelombang 240-270 nm. Data ini khas untuk senyawa turunan flavon. Dalam hal ini serapan pada pita I yang muncul pada λ_{maks} 353 nm dengan intensitas yang lebih rendah dari pada pita I (279 nm)

menunjukkan adanya gugus isoprenil bebas pada cincin B. Gugus isoprenil dan gerakan rotasi ini akan menyebabkan halangan sterik terhadap keplanaran sistem kromofor sinamoil sehingga konjugasi elektron pada sistem kromofor tersebut tidak dapat berlangsung baik. Penambahan reagen geser NaOH menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 37 nm mengindikasikan bahwa senyawa **3** memiliki gugus hidroksi bebas pada C-4'. Spektrum IR dari senyawa ini memperlihatkan gugus fungsi utama dari suatu flavon, dimana gugus C=O terkonjugasi muncul pada 1649 cm⁻¹ dan vibrasi ulur C=C aromatik muncul pada 1620-1359 cm⁻¹, sementara serapan untuk gugus -OH terlihat pada 3382 cm⁻¹, selain itu serapan C-H alifatik tampak didaerah 2963 dan 2924 cm⁻¹ yang memperkuat dugaan adanya gugus isoprenil pada senyawa ini. Berdasarkan

analisis di atas disarankan bahwa senyawa hasil isolasi adalah suatu flavon yang terisoprenilasi pada posisi C-3. Spektrum ¹H NMR memperlihatkan bahwa senyawa **3** mempunyai tiga proton aromatik di cincin B yang muncul sebagai sistem ABX pada δ_H 6,53 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H-3'), 6,48 (1H, dd, *J*=8,4;2,2 Hz, H-5'), dan 7,14 (1H, d, *J*=8,4 Hz, H-6'). Adanya sinyal-sinyal tersebut menunjukkan bahwa cincin B dari senyawa **3** memiliki substituen OH pada C-2' dan C-4' sebagaimana lazimnya flavonoid yang berasal dari tumbuhan *Artocarpus*. Adanya sinyal singlet pada δ_H 13,40 adalah karakteristik untuk gugus OH pada C-5 yang membentuk khelat dengan gugus karbonil pada C-4. Spektrum ¹H NMR senyawa **3** juga memperlihatkan sinyal pada δ_H 6,38 (1H, s, H-8) yang memberi petunjuk bahwa pada cincin A tersubstitusi

Tabel 3. Perbandingan data NMR senyawa **3** dan literatur

No. C	¹ H NMR (δ _H (integrasi, <i>multipl.</i> , <i>J</i> dalam Hz))		¹³ C NMR (δ _C)	
	Senyawa 3 (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 3 * (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 3 (aseton- <i>d</i> ₆)	Senyawa 3 * (aseton- <i>d</i> ₆)
2	-	-	162,1	162,0
3	-	-	121,4	121,5
4	-	-	182,9	183,0
4a	-	-	104,9	105,0
5	-	-	159,9	160,0
6	-	-	111,7	111,8
7	-	-	162,4	162,3
8	6,38 (1H, s)	6,40 (1H, s)	93,4	93,5
8a	-	-	157,0	157,0
9	3,08 (2H, d, <i>J</i> =6,9)	3,12 (2H, d, <i>J</i> =7)	24,5	24,6
10	5,10 (1H, m)	5,14 (1H, m)	122,7	122,7
11	-	-	131,9	132,0
12	1,41 (3H, s)	1,43	25,8	25,8
13	1,55 (3H, s)	1,57	17,8	17,9
14	3,33 (2H, d, <i>J</i> =6,9)	3,41 (2H, br, d, <i>J</i> =7)	21,9	22,0
15	5,25 (1H, m)	5,29 (1H, m)	123,3	123,4
16	-	-	131,3	131,5
17	1,75 (3H, s)	1,78 (3H, s)	25,7	25,8
18	1,62 (3H, s)	1,65 (3H, s)	17,6	17,6
1'	-	-	112,9	113,1
2'	-	-	157,2	157,2
3'	6,53 (1H, d, <i>J</i> =2,2)	6,57 (1H, d, <i>J</i> =2)	103,7	103,8
4'	-	-	161,4	161,4
5'	6,48 (1H, dd, <i>J</i> =8,4; 2,2)	6,52 (1H, dd, <i>J</i> =8 ; 2)	107,9	108,0
6'	7,14 (1H, d, <i>J</i> =8,4)	7,19 (1H, d, <i>J</i> =8)	132,1	132,3

* Kudraflavon C (Hano, 1990)

oleh gugus OH pada posisi C-5 dan C-7 dan substituen isoprenil pada posisi C-6. Dari analisis spektrum ^1H NMR tersebut, maka dapat disarankan bahwa senyawa **3** adalah 5,7,2',4'-tetrahidroksi-3,6-diisoprenil-flavon atau kudraflavon C. Bukti lain yang menunjang analisis ini adalah dari spektrum ^{13}C NMR yang menunjukkan adanya 25 atom karbon, 6 diantaranya adalah karbon jenis oksil aril (δ_{C} 157,0, 157,2, 159,9, 161,4, 162,0, 162,4), satu karbon karbonil pada δ_{C} 182,9, empat karbon metil (δ_{C} 17,6, 17,8, 25,7, 25,8), serta dua karbon metilen (δ_{C} 21,9, 24,5). Bukti tambahan spektrum ^1H dan ^{13}C NMR yang menunjang struktur senyawa **3** adalah dengan membandingkan data spektrum ^1H dan ^{13}C NMR dengan data yang sama dari kudraflavon C yang telah dilaporkan sebagaimana dinyatakan pada Tabel 3.

Senyawa **4** diperoleh sebagai kristal jarum berwarna kuning pucat dengan titik leleh 174-177°C. Spektrum UV senyawa ini dalam metanol memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 320 (bahu) (pita I) dan 279 (pita II) nm. Pola spektrum UV ini mengindikasikan flavon yang terisoprenilasi pada C-3. Penambahan reagen geser NaOH memberikan pergeseran batokromik sebesar 39 nm pada pita I, yang menunjukkan adanya gugus -OH bebas pada posisi C-4' dicincin B. Keberadaan gugus -OH ini didukung oleh spektrum senyawa **4** yang menunjukkan adanya pita serapan pada 3393 cm^{-1} . Spektrum senyawa **4** juga memperlihatkan serapan untuk gugus fungsi utama dari suatu flavon yaitu serapan karbonil pada 1621 cm^{-1} dan vibrasi ulur C=C aromatik (1352-1621 cm^{-1}), sementara serapan untuk C-H alifatik terlihat pada 2959 cm^{-1} . Data spektrum IR senyawa **4** tersebut identik dengan data yang sama dari artokarpin yang sebelumnya telah diisolasi dari tumbuhan *A. champeden* (Hakim, 1998). Bukti tambahan terhadap senyawa **4** diperoleh dari hasil perbandingan KLT antara senyawa **4** dengan senyawa artokarpin yang memperlihatkan nilai R_f yang sama pada tiga sistem eluen yang berbeda. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa **4** adalah artokarpin.

Senyawa **1** diketahui menunjukkan aktivitas anti malaria *in vitro* terhadap *P. falciparum* dengan harga EC_{50} sebesar 8,2 $\mu\text{g/mL}$ (Boonlaksiri, 2000). Selain itu juga, Senyawa **3**

dan **4** diketahui bersifat sitotoksik terhadap sel murine P-388 dengan aktivitas yang kuat, dengan nilai IC_{50} berturut-turut 3,30 dan 1,90 $\mu\text{g/mL}$ (Hakim, 1998). Senyawa **4** dilaporkan juga dapat menghambat transport asam amino leusin melalui membrane usus ulat sutera *Bombyx mori*, dengan nilai IC_{50} 3,65 mmol/L (Parenti, 1997).

4. Kesimpulan

Dari ekstrak metanol kayu akar *A. integer* telah berhasil ditemukan satu senyawa stilben terprenilasi, *trans*-4-isopentenil-3,5,2',4'-tetrahidroksistilben (**1**), satu senyawa turunan flavanon, artokarpanon (**2**), dan dua senyawa flavon terprenilasi, kudraflavon C (**3**) dan artokarpin (**4**). Hasil uji biologis menunjukkan bahwa senyawa **1** memiliki aktivitas sebagai anti malaria dengan EC_{50} sebesar 8,2 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan senyawa **3** dan **4** bersifat sitotoksik terhadap sel murine P-388 dengan nilai IC_{50} berturut-turut 3,30 dan 1,90 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian ini memberi gambaran bahwa tumbuhan dari genus *Artocarpus* ini berpotensi sebagai sumber bahan kimia yang bermanfaat.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada staf Herbarium Bandungense Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung yang telah mengidentifikasi spesimen tumbuhan.

6. Daftar Pustaka

- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Makmur, L., Suyatno, Aimi, N., dan Ghisalberty, E.L. (1996). "New Prenylated Flavone from *Artocarpus champeden*", *J.Nat.Prod.*, 59, 878.
- Boonlaksiri, C., Oonant, W., Kongsaree, P., Kittakoo, P., Tanticharoen, M., dan Thebtaranonth, Y. (2000). "An Antimalarial Stilbene from *Artocarpus integer*", *Phytochemistry*, 54:4, 415-418, Abstract.
- Hakim, E.H., Marlina, E.E., Mujahidin, D., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., dan Makmur, L. (1998). "Artokarpin dan Heteroflavanon-A, Dua Senyawa Bioaktif dari *Artocarpus champeden*", Lembaga Penelitian ITB.
- Hakim, E.H., Fahriyati, A., Kau, M.S., Achmad, S.A., Makmur, L., Ghisalberty, E.L., dan Nomura, T. (1999). "Artoindonesianins A and B, Two New Prenylated Flavones from the Root of *Artocarpus champeden*", *J.Nat.Prod.*, 62:4, 613-615, Abstract.
- Hano, Y., and Nomura, T, *Heterocycles*, 1990, 31 (7), 1339-1344

Rani Maharani, Euis H. Hakim, Yana M. Syah, Lukman Makmur, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad, Ikram M. Said, Laily Bin Din, Jalifah Latip

- Heyne, K. (1987). "Tumbuhan Berguna Indonesia II", Jilid II, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.
- Kundu, G.C., dan Sinha, N.K. (1989). "Purification and Characterization of Proteinase Inhibitor from *Artocarpus integrifolia*", *Phytochemistry*, 28:3, 725-728, Abstract.
- Likhitwitayawuid, K., dan Sritularak, B. (2001). "A New Dimeric Stilbene with Tyrosinase Inhibitory Activity from *Artocarpus gomezianus*", *J.Nat.Prod.*, 64:11, 1457-1459, Abstract.
- Lu, C. -M., Lin, C. -N., Huang, P. -L., *Phytochemistry*, **1995**, 39 (6), 1441-1451
- Lu, Y., Lin, C., Ko, H., Yang, S., Tsao, L., dan Wang, J. (2003). "Novel Anti-inflammatory Constituents of *Artocarpus rigida*", *Helv.Chim.Acta.*, 86:7, 2566-2572, Abstract.
- Parenti, P., Pizzigoni, A., Hazonet, G., Hakim, E.H., Makmur, L., Achmad, S.A., dan Giordana, B. (1997). "A New Prenylated Flavone from *Artocarpus champeden* Inhibits the K⁺-Dependent Amino Acid Transport in *Bombyx mori* Midgut", *Biochem. Biophys. Res. Communic.*
- Syah, Y. M., Achmad, S.A., Ghisalberty, E.L., Hakim, E.H., Makmur, L., dan Mujahidin, D. (2002). "Artoindonesianis Q-T, Four Isoprenylated Flavones from *Artocarpus champeden* Spreng. (Moraceae)", *Phytochemistry*, 61:8, 949-954, Abstract.
- Zerega, Noor, dan Motley. (2004). "Artocarpus Phylogeny", dalam In Preparation for Post Doctoral Research, <http://geo.cbs.umn.edu/~nyree/>

A Study on Incineration on Oil Sludge Contaminated with Naturally Occurring Material

Redzuwan Yahaya, Amran Ab.Majid & Muhamad Samudi Yasir

Nuclear Science Programme, Faculty of Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan

Abstract

One of the major problem facing oil processing industries is the accumulation of oil sludge contaminated with naturally occurring material (NORM). This is generated through the reprocessing of crude oil drawn from the ground with numerous concentration of natural radionuclides of ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra and ^{40}K . One of the common method is through the storage of the oil sludge. But due to large volume accumulated through the years these have pose a major problem in term of storage space and of the level of radioactivity concentration present. This study was conducted to see whether a suitable alternative method such as incineration can be employed in the disposal of oil sludge contaminated with NORM. The specific activity of NORM were determined using HPGe-Gamma spectrometry system, The result shows that the specific radioactivity of ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra and ^{40}K after incineration at a temperature of $1150\text{ }^{\circ}\text{C}$ indicate no significant risk of external exposure to both personnel and environment. This suggest a suitability of using incineration method in disposal of the NORM contaminated oil sludges.

Key words: oil sludge, natural radionuclides, ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra and ^{40}K , incineration.

1. Introduction

One of the waste product of the oil processing industries is the oil sludge waste which is continuously accumulated over the years. It would not have posed a major problem to the industry had it not contained naturally occurring radioactive materials (NORM). This is due to the present of ^{238}U , ^{232}Th and ^{40}K from the earth crust that had been drawn in along with the crude oil. Studies that have been conducted by Heaton et. al (1995) and by Shawky (2001) have shown an increase in radioactivity levels of naturally occurring materials in the oil processing industry. A study conducted by Amran et al. (2003) have shown that local oil sludge wastes contain average specific activities of ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra and ^{40}K at about $25.1 \pm 12.7\text{ Bq/kg}$, $22.9 \pm 14.2\text{ Bq/kg}$, $14.9 \pm 11.9\text{ Bq/kg}$, $15.7 \pm 2.3\text{ Bq/kg}$ and $349.6 \pm 13.3\text{ Bq/kg}$ respectively. A common approach to the disposal is to store them in barrels and left in empty fields situated at the oil processing plant. Over the years the

accumulation of oil sludge wastes has increased by sizable amount and quantity This has resulted in the wasteful used of precious land that is needed in the expansion of the plant. A more efficient method of disposal has not been adopted and practiced, due to the lack of facility and technology available in Malaysia.

With the availability of a large incinerator as in the Malaysia Waste Management Centre in Seremban, Negri Sembilan, a possible method suggested is by incineration. Due to the very few data available on the incineration of oil sludge wastes, a study was conducted to see whether incineration was suitable and whether radioactivity concentration would increase significantly should this be the choice of disposal.

2. Methods

The incinerator of study was of a rotary kiln type designed to process solid waste, high value liquid waste and aqueous waste working at an operating temperature of $1150\text{ }^{\circ}\text{C}$. *In-situ*

radiation measurements were conducted at the storage site of a Crude Oil Terminal in the East Coast of Malaysia and at the Waste Management Centre in Seremban, Negri Sembilan, Malaysia, before and after incineration using portable survey meters. Area and personnel monitoring using thermoluminescent dosimetry (TLD 4500 Harshaw-Bicron) system with TLD100H chipstrates, were conducted at various location of the incinerator complex and to every personnel involved during incineration and storage.

Oil sludge waste that have been incinerated were in the form of ash and slag, where activity for ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra and ^{40}K were counted using a calibrated HPGe-PCA system. Identification and activity counts were done using SAMPO 90 with SRM IAEA 375 (Soil) as standard.

3. Results and Discussion

The radiation dose at the Crude Oil Terminal was found to be between 0.10 – 0.20 $\mu\text{Sv/hr}$ while the radiation dose at the Waste Management Centre was 0.30 $\mu\text{Sv/hr}$ (before incineration) and was between 0.25 – 0.35 $\mu\text{Sv/hr}$ (after incineration). Both facilities gave different readings due to the geological structure of the area, with higher readings at the Waste Management Centre. There is a slight increase in radiation dose after incineration but the value is very much less even for a normal clean area of about 2.5 $\mu\text{Sv/hr}$.

The equivalent dose for various locations in the Waste Management Centre recorded values of between 52.22 – 142.08 $\mu\text{Sv/month}$ while for personnel radiation dose, values of between 9.31 – 14.38 $\mu\text{Sv/month}$.

A summary of NORM present and NORM specific activity for the study are given in Table 1 and 2 respectively. Results have shown that

the specific activity for ^{238}U increases from 25.3 Bq/kg to 97.3 Bq/kg. Estimates have shown that total activity of ^{238}U decreases by 4.4 % compared to 13.9 % for ^{232}Th after incineration. A much higher loss in ^{226}Ra of about 34.3 % is because of its lower melting point ($< 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$). Estimates of the loss for ^{238}U and ^{232}Th are acceptable due to the inhomogeneity of NORM in oil sludge waste used.

4. Conclusions

There no significant increase in terms of dose exposure to the workers and the environment. NORM specific activity level in local oils sludge wastes is low and is comparable to normal soil. Incineration process used have reduced the weight of oil sludge waste by half. The study shows that the incineration of NORM contaminated oil sludge is one of the most suitable method of disposal in Malaysia.

5. Acknowledgements

We would like to thank supporting staff of the Nuclear Science Programme, School of Applied Physics in assisting this research.

6. References

- Heaton, B. and Lambley, J. 1995. Tenorm in oil, gas and mineral mining. *Appl. Radiat. Isot.* 46: 577 – 581.
- Shawky, S., Amer, H. Nada, A.A., Abd El-Maksoud, T.M. and Ibraheim, N.M. 2001. Characteristics of NORM in the oil industry from Eastern and Western deserts of Egypt. *App. Radiat. Isot.* 55: 135 – 139.
- Amran Ab. Majid, Muhamad Samudi Yasir, Redzuwan Yahaya dan Suzana Abu Bakar. 2003. Analisis Radionuklid Tabii dalam Sampel Sisa Enapcemar Petroleum Tempatan. *Analytical Chemistry: Application and Current Issues*, pg 142 – 148.

LAMPIRAN

Table 1: Summary of Specific Activities of NORM radionuclides in oil sludge wastes before and after incineration (Bq/kg)

Sample	Specific Activity (Bq/kg)								
	U-238			Ra-226			Th-232		
Range	Before	After		Before	After		Before	After	
		Ash	Slag		Ash	Slag		Ash	Slag
		17.5 – 37.5	26.4 – 81.7	13.6 – 18.0	7.2 – 28.2	13.7 – 20.3	6.0 – 9.6	12.9 – 30.0	23.6 – 44.2
Average	25.3 ± 6.0	58.4 ± 19.9	15.8 ± 2.2	13.5 ± 7.8	19.2 ± 3.5	7.7 ± 1.8	21.6 ± 5.6	43.1 ± 11.8	13.7 ± 0.4
Total Estimates activity loss (Bq/kg)		97.24	30.68		31.97	14.95		71.76	26.60
	133.84	127.92		71.42	46.92		114.26	98.36	
% change (+/-)		- 4.42			- 34.30			- 13.91	

Table 2: Summary of Specific Activities of NORM radionuclides in oil sludge wastes before and after incineration (Bq/kg)

Sample	Specific Activity (Bq/kg)					
	Th-228 (Ra-228)			K-40		
Range	Before	After		Before	After	
		Ash	Slag		Ash	Slag
		12.6 – 18.6	23.7 – 48.2	13.5 – 15.1	238.1 – 410.4	563.2 – 1004.9
Average	15.8 ± 2.3	41.5 ± 9.2	14.13 ± 0.9	322.6 ± 53.1	873.5 ± 166.6	291.2 ± 40.7
Total Estimates activity loss (Bq/kg)		69.10	27.44		1454.4	565.5
	83.58	96.54		1706.6	2019.9	
% change (+/-)		+ 15.50			+ 18.36	

*Notes : Total Activity Estimates (kBq) = average specific activity of radionuclides (Bq/kg) x total sample weight (kg). For initial NORM activities (before incineration, weight used = 6250 - 960 = 5290 kg)

I Sorpsi Air Pengeringan Ikan Kayu Tongkol (*Euthynnus affinis*)

Rita Hayati¹⁾, Aminah Abdullah²⁾, Mohd.Khan Ayob³⁾, Soewarno T. Soekarto⁴⁾

1) Jurusan Kimia dan Teknologi Makanan Universitas Kebangsaan Malaysia
Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi,
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail: ritanabila@yahoo.com

2) Jurusan Kimia dan Teknologi Makanan Universitas Kebangsaan Malaysia
Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi,
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail: kama@pkrisc.cc.ukm.my

3) Jurusan Kimia dan Teknologi Makanan Universitas Kebangsaan Malaysia
Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Pangan, Fakultas Sains dan Teknologi,
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia
e-mail: mkhan.ukm.my

4) Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, FATETA, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, Bogor-Indonesia

Abstrak

Tongkol dried fish (Ikan Kayu Tongkol) is lumps of less salted dried fish usually used as popular ingredient for some traditional fish dishes in Aceh as well as in Malaysia. In Japan it is further processed to Katsou-bushi for preparation of special sup. The objective of this research was to find out water relation parameters in the less salted dried fish as related to shelf life, characteristic changes during storage and estimate analysis of its expired date. Dried fish samples were equilibrated in 15 levels of RH at 28^oC and their equilibrium moisture contents were determined.

Moisture sorption isotherm derived from the correlation of equilibrium moisture content data indicated a typical sigmoidal curve implying 3 regions of water adsorption. The water sorption regions accounted for three fractions of bound water as analyzed using three different mathematical models. The first water fractions ranged 0 – 5.95 %, the second 5.95 – 17.52 % and the third fraction ranged 17.52 – 91.12 % dry basis, equivalent to 0 – 5.6 %, 5.6 – 14.9 % and 14.9 – 47.4 % wet basis respectively.

Keywords : *Tongkol, dried, sorption isotherm*

1. Pendahuluan

Sorpsi air oleh bahan pangan adalah fenomena proses dimana molekul air berasosiasi secara progresif dan reversibel dengan bagian solid pangan melalui sorpsi kimia, adsorpsi fisik, dan kondensasi multilayer (Heldman dan Lund, 1992). Isotermi Sorpsi Air (ISA) menggambarkan hubungan antara kelembaban relatif (RH) udara/aktivitas air (a_w) dengan kadar air keseimbangan dan unik untuk setiap

bahan. Kurva ISA tersebut dapat digunakan untuk menentukan sifat-sifat produk, parameter pengeringan, pengemasan dan penyimpanan pangan (Labuza, Kaanane, Chen, 1985; Van den berg, 1986; Muterjemi, 1988; Bimbenet and Loncin, 1995; Hayati, R, 2001; Wulandari, N, 2002; Pratiwiningsih, I, 2004). Di samping itu ISA juga menggambarkan adanya berbagai struktur air dalam bahan (Soekarto, 1978) yaitu adanya tiga fraksi air terikat primer, air terikat

sekunder dan air terikat tersier. Menurut Anguilera dan Stanley (1990) dan Fellow (1992), keunikan bentuk kurva ISA disebabkan oleh perbedaan struktur fisik, komposisi kimia dan kondisi pengikatan air didalam bahan pangan.

Nilai a_w dan M_e merupakan variable yang dapat digunakan untuk analisis pendugaan kerusakan pangan atau untuk menentukan waktu pengeringan yang diperlukan untuk stabilitas produk. Labuza (1984) menyatakan bahwa a_w bahan pangan sangat menentukan kondisi penerimaan atau kehilangan air dari bahan pangan, sehingga dikembangkan model matematik yang dapat digunakan untuk memperkirakan umur simpan produk. Tidak adanya data dan informasi umur simpan pada ikan kayu tongkol, memerlukan penelitian lebih lanjut.

Ikan kayu yaitu suatu produk ikan kering ukuran besar dengan pemberian sedikit garam dan menjadi bahan dasar untuk pengolahan lebih lanjut. Di Aceh ikan kayu banyak digunakan untuk pembuatan masakan seperti tumis ikan kayu, *asam ke'eng* dan otak-otak. Di Jepang ikan kayu diolah lebih lanjut menjadi *Katsou-bushi* yang sangat populer sebagai bahan pembuatan sup (Akio Kanazawa, 1961).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan ISA pada ikan kayu tongkol serta untuk menentukan kondisi proses penggudangan dan penyimpanan. Informasi tersebut dapat digunakan untuk dijadikan bahan penyuluhan

bagi produsen ikan kayu tongkol. Data ISA ikan kayu tongkol sangat penting untuk memahami daya simpan, kondisi pengeringan dan parameter kritikal pada pengeringan dan penyimpanan.

2. Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan bahan ikan kayu tongkol yang dibuat di Malaysia dan 15 jenis bahan kimia untuk mengatur kelembaban relatif (RH) dalam desikator. Bahan kimia diperoleh dari Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi IPB, Bogor. Untuk mengatur RH desikator digunakan larutan garam jenuh (Tabel 1).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan gelas untuk penyiapan larutan garam jenuh, desikator kecil untuk penentuan isoterme sorpsi, inkubator suhu 28 °C untuk penempatan desikator, alat pengering kemoreaksi oven bersuhu 105 °C untuk menentukan kadar air, neraca analitik dan desikator besar berisi gel silika.

Masing masing larutan garam jenuh dibuat sebanyak 100 ml untuk setiap desikator. Bahan contoh ikan kayu diturunkan kadar airnya dengan pengering kemoreaksi sampai tercapai kadar air 2 %. Contoh ditimbang kurang lebih 2 gram kemudian dimasukkan ke dalam cawan dan ditimbang di dalam desikator. Desikator disimpan dalam ruang inkubator suhu 28°C, dan setiap hari dilakukan penimbangan contoh sampai setimbang. Keseimbangan kadar air bahan contoh kemudian diukur dengan metoda oven (AOAC,

Tabel 1. Nilai RH udara di atas larutan garam jenuh dan keseimbangan kadar air (M_e) ikan kayu tongkol pada suhu 28 °C.

No.	Larutan	RH (%)	M_e (% bk)
1.	MgCl ₂	32.4	4.17
2.	K ₂ CO ₃	43.7	6.61
3.	NaBr	56.8	9.91
4.	NaNO ₂	64.0	14.29
5.	KI	68.2	14.89
6.	SrCl ₂	71.0	17.03
7.	NaNO ₃	73.0	20.37
8.	KBr	80.2	25.33
9.	KCl	83.8	35.47
10.	Na ₂ SO ₄	85.9	33.33
11.	K ₂ CrO ₄	86.4	37.79
12.	BaCl ₂	90.3	47.32
13.	NH ₄ H ₂ PO ₄	92.7	55.49
14.	KNO ₃	93.0	64.28
15.	K ₂ SO ₄	97.0	116.13

1995).

3. Hasil dan Pembahasan

Isotermi Sorpsi Air Ikan Kayu Tongkol

Hasil pengukuran kadar air keseimbangan (M_e pada Tabel 1) dihubungkan dengan nilai a_w bahan secara adsorpsi maka diperoleh kurva isotermi sorpsi air (ISA) untuk ikan kayu tongkol (Gambar 1A). Kurva ISA yang dihasilkan mempunyai bentuk sigmoid, yaitu bentuk isotermi tipe II. Menurut Labuza (1984) bentuk kurva sigmoid merupakan bentuk yang umum dijumpai pada sebagian besar bahan pangan. Bentuk kurva sigmoid ini memperlihatkan adanya tiga daerah kurva yang berbeda dampaknya terhadap karakteristik dan daya awet produk.

Soekarto (1978), Labuza (1984), Aguilera dan Stanley (1999) membagi kurva ISA menjadi 3 daerah air yaitu daerah air terikat primer (monolayer), daerah air terikat sekunder (multilayer), dan daerah air terikat tersier (air pelarut, pelunak produk).

Analisis Air terikat primer

Air terikat primer atau fraksi air pertama menunjukkan bagian air yang terikat sangat kuat oleh bahan kering (solid), dan merupakan adsorpsi air yang bersifat satu lapis molekul air atau monolayer (Van den Berg dan Bruin, 1981). Air terikat primer dapat ditentukan dengan menggunakan model matematika isotermi sorpsi air BET, yang penerapannya hanya berlaku pada a_w 0.05-0.60 (Rizvi, 1995). Dengan persamaan (1)

$$\frac{a_w}{(1-a_w)} = \frac{1}{M_p c} + \frac{(c-1)a_w}{M_p c} \quad (1)$$

dimana M adalah kadar air (%bk), c adalah konstanta, M_p adalah kapasitas air terikat primer (% bk). Plot persamaan BET dapat dilihat pada Gambar 1B.

Persamaan (1) dapat dipandang sebagai rumus regresi linier, yang hasil analisis regresi untuk ikan kayu tongkol adalah persamaan regresi (2) :

$$Y = 0,0861x + 0,0815 \quad (R^2 = 0,7685) \quad (2)$$

Dari persamaan regresi (2) tersebut nilai konstanta regresi a dan b dimasukkan ke dalam persamaan (1) sehingga menjadi :

$$a = 1/M_p c, \quad b = (c-1)/M_p c \quad b/a = (c-1)$$

Dari persamaan regresi diketahui nilai $a = 0,0815$ dan $b = 0,0861$ sehingga :

$$b/a = (c-1) = 0.0862/0.0815, \text{ jadi } c = 2,056$$

$$a = 1/M_p c = 0.0815, \text{ jadi } M_p = 5,95 \% \text{ bk}$$

Analisis Air Terikat Sekunder

Air terikat sekunder atau fraksi air kedua merupakan lapisan multilayer (Rockland, 1969). Untuk menentukan kapasitas air terikat sekunder digunakan model analisis logaritma yang dikemukakan oleh Soekarto (1978), dengan persamaan umum (3):

$$-\log(1-a_w) = p + q (M) \quad (3)$$

dimana M adalah kadar air (g air/g bahan kering) pada aktivitas air a_w , a adalah titik potong pada ordinat dan b adalah faktor kemiringan. Plot logaritma ikan kayu tongkol dapat dilihat pada Gambar 1C.

Menurut Soekarto (1978), plot data persamaan tersebut menghasilkan garis lurus yang patah menjadi dua garis lurus. Plot persamaan tersebut dapat dilihat pada Gambar 3C. Garis lurus pertama mewakili fraksi air terikat sekunder dari data M di daerah 6 – 18 % dengan persamaan (3a):

$$-\log(1-a_w) = p_1 + q_1 (M) \quad (3a)$$

dan garis lurus kedua mewakili fraksi air terikat tersier dari data M di daerah di atas 18 % dengan persamaan (3b) :

$$-\log(1-a_w) = p_2 + q_2 (M) \quad (3b)$$

Titik potong kedua garis merupakan batas daerah fraksi air kedua dan ketiga dan nilainya sebagai kapasitas air terikat sekunder (M_s) yang dapat diperoleh dari menggabungkan persamaan (3a) dan (3b) menjadi persamaan (4) :

$$p_1 + q_1 M_s = p_2 + q_2 M_s \quad (4)$$

Dari dua analisis regresi linear persamaan (3a dan 3b) diperoleh persamaan regresi (5a dan 5b) :

$$Y_1 = 0,0278x + 0,0625 \quad R^2 = 0,9738 \quad (5a)$$

$$Y_2 = 0,0153x + 0,2815 \quad R^2 = 0,9841 \quad (5b)$$

Kapasitas air terikat sekunder (M_s) diperoleh dengan menyatukan persamaan 5a dan 5b menjadi persamaan (6) :

$$a_1 + b_1 M_s = a_2 + b_2 M_s$$

$$0.0625 + 0.0278 M_s = 0.2815 + 0.0153 M_s \quad (6)$$

$$0.0125 M_s = 0.219$$

$$M_s = 17.52$$

Dengan memasukkan nilai M_o dan M_s ke persamaan (5a dan 3a) dapat diperoleh nilai a_w batas pertama dan kedua sebagai a_w kritikal pertama (a_p) dan kritikal kedua (a_s).

$$-\log(1-a_p) = p_1 + q_1 M$$

$$-\log(1-a_p) = 0.0625 + 0.0278 (5.95) = 0.2279$$

$$1-a_p = 0.59$$

$$a_p = 0.41, \text{ setara dengan RH} = 41 \%$$

$$-\log(1-a_s) = 0.0625 + 0.0278 (17.52) = 0.5495$$

$$-\log(1-a_s) = 0.5495$$

$$1-a_s = 0.26$$

$$a_s = 0.74, \text{ setara dengan RH} = 74 \%$$

Aktivitas air kritikal sangat penting dan terkait dengan stabilitas atau kerusakan produk kering. Apabila reaksi deteriorasi kimiawi terjadi pada daerah fraksi air kedua maka kerusakan produk kering oleh pertumbuhan mikroba terjadi di daerah fraksi air ketiga. Aktivitas air dapat memberikan indikasi batas terendah untuk pertumbuhan mikroorganisme tahan garam (a_w 0.60), sebagian besar jamur (a_w 0.80), yeast (a_w 0.87) dan bakteri patogen (a_w 0.91) (Aguilera dan Stanley, 1999).

Analisis Air Terikat Tersier

Daerah air terikat tersier merupakan daerah fraksi air ketiga yang terikat lemah dan mempunyai sifat mendekati air bebas (*bulk water*). Pada daerah ini mikroba dapat tumbuh dan produk akan dirusak oleh pertumbuhan mikroba.

Penentuan kapasitas air terikat tersier didasarkan pada konsep bahwa air bebas (air

murni sempurna) mempunyai $a_w = 1$. Jadi kadar air terendah menghasilkan $a_w = 1$, merupakan batas antara fraksi air terikat tersier dengan air bebas. Penentuan nilai batas atas air terikat tersier (M_t) dilakukan melalui 2 pendekatan yaitu pertama, metoda extrapolasi dengan analisis regresi model polynomial ordo 2 (Gambar 1D) dan kedua, metoda ekstrapolasi manual (Gambar 2). Keduanya menggunakan data ISA dari daerah air terikat tersier, daerah kadar air 18 % bk ke atas.

Dari hasil analisis regresi polynomial ordo 2 (Gambar 1D) diperoleh persamaan regresi (7) :

$$Y = 817.06 x^2 - 1141.3 x + 415.35 \quad (R^2 = 0.982) \quad (7)$$

$$= 817.06 (1)^2 - 1141.3 (1) + 415.35$$

$$= 91.2, \text{ jadi } M_t = 91.2 \% \text{ bk}$$

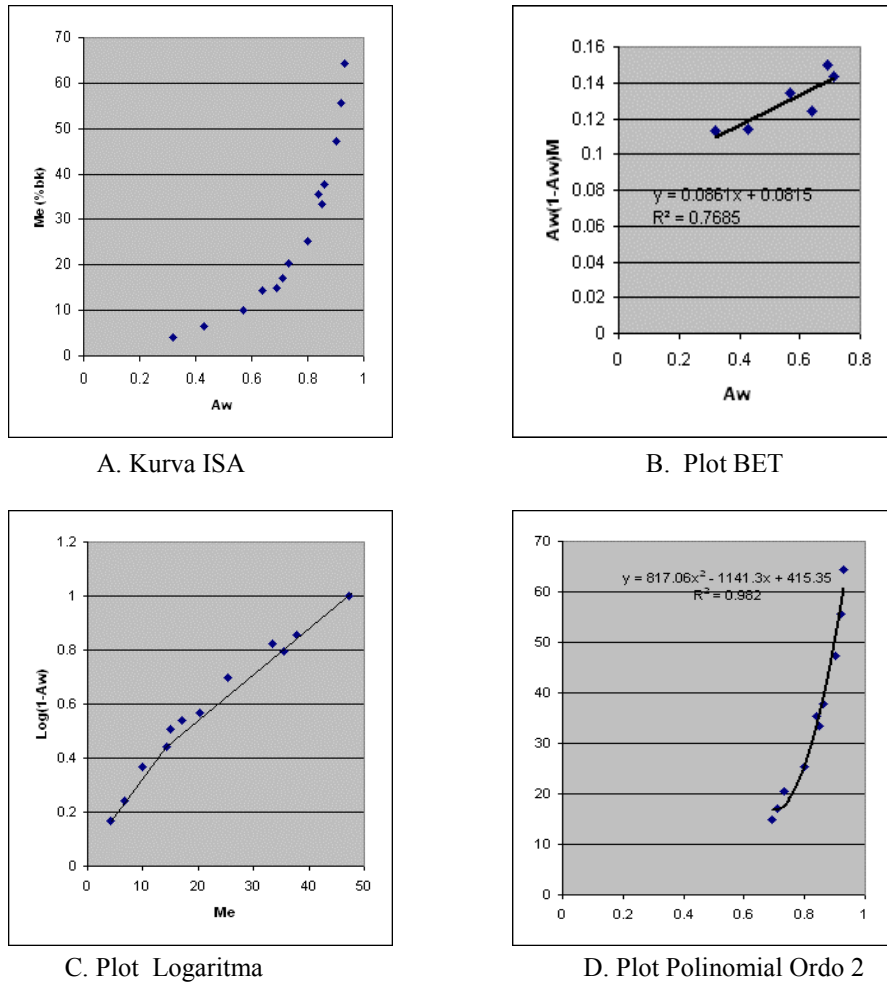
dimana adalah Y kadar air dan x aktivitas air. Dengan memasukkan nilai $x = a_w = 1$, pada rumus (7) maka diperoleh nilai Y yaitu nilai kapasitas air terikat tersier (M_t) = 91.2 %. Dengan cara ekstrapolasi manual (Gambar 2) diperoleh nilai $M_t = 90 \%$ bk.

Ikan tongkol segar sebelum dikeringkan dan hasilnya setelah menjadi ikan kayu disajikan pada Gambar 3. Sebelum diproses lebih lanjut biasanya ikan kayu disimpan dalam wadah sebagai persediaan (stok) bahan pangan.

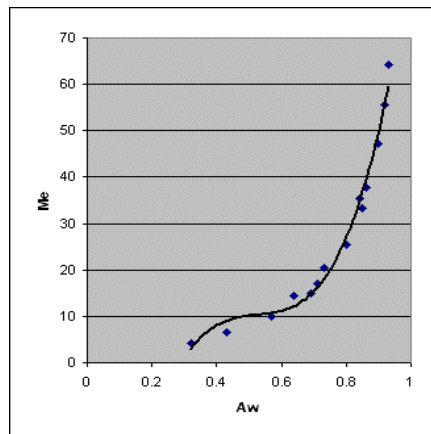
Berbagai analisis telah dihasilkan parameter kritikal yang berguna untuk prediksi karakteristik daya simpan ikan kayu tongkol (Tabel 3). Dari ketiga batas daerah sorpsi air Tabel 3 dapat diperoleh besarnya fraksi air terikat masing-masing primer (ATP) 5.95 %, sekunder (ATS) 11.57 % dan tersier (ATT) 73.68 %.

Tabel 3. Parameter kritikal ikan kayu tongkol dan prediksi karakteristik produk dalam penyimpanan

Parameter	Nilai	Prediksi karakteristik produk
M_o , % bk % bb	5.95 5.60	Di bawah itu produk keras, getas/rapuh, sangat stabil
M_s , % bk % bb	17.52 14.90	Di bawah itu produk tidak getas, kuat wulet, lama-lama dapat menjadi coklat, apek, tengik
M_t , % bk % bb	91.20 47.70	Di bawah itu produk lentur, mula-mula berjamur, atau berlendir, produk menjadi rusak/busuk
a_p	0.40	Batas a_w mulai perubahan kimiawi, di bawah itu produk sangat stabil
a_s	0.74	Batas a_w produk mulai ditumbuhi kapang, makin tinggi rusak oleh bakteri



Gambar 1. Kurva ISA dan plot ISA menurut plot BET, plot logaritma, plot polinomial ordo 2 dari ikan kayu tongkol



Gambar 2. Ekstrapolasi Pada Penentuan Air Terikat Tersier Ikan Kayu Tongkol

4. Kesimpulan

Kurva isoterme sorpsi air ikan kayu tongkol berbentuk tipikal sigmoid, meliputi 3 daerah sorpsi air yaitu daerah fraksi air pertama antara 0 – 6.0 %, kedua 6.0 – 17.6 % dan ketiga 17.6 – 91.2 % bk (atau dalam basis basah fraksi air

pertama 0 – 5.6 %, kedua 5.6 – 14.9 dan ketiga 14.9 – 47.4 % bb).

Besarnya kandungan ketiga fraksi air terikat pada ikan kayu tongkol yaitu masing-masing primer (ATP) 6.0 %, sekunder (ATS) 11.6 % (2



Gambar 3A. Ikan tongkol segar (*Euthynnus affinis*)



Gambar 3B. Ikan kayu tongkol

X ATP) dan tersier (ATT) 73.6 % bk (12 X ATP).

5. Ucapan Terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Soewarno T. Soekarto atas fasilitas penelitian yang telah diberikan.

6. Daftar Pustaka

AOAC, 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official of Analytical Chemist, Washington D.C.

Aguilera, J.M. and D.W. Stanley. 1990. Microstructural Principles of Food Processing Engineering. Elsevier Applied Science, London, New York.

Akio Kanazawa. 1961. Katsou-bushi : Dried Bonito Stick. Faculty of Fisheries Kagoshima University, Jepang.

Bimbenet and Loncin 1995. Equilibre entre Phases, Activite de L'eau, Bases du Genie des Procedes Alimentaires, Mason, Paris. Pp. 53-58.

Fellow, P. 1992. Food Processing Technology Principles and Practice. Ellis Horwood, New York.

Hayati, R. 2001. Kajian Penggaraman dan Pengerinan Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dalam Pembuatan *Asam Sunti* Dari Aceh. Tesis. Program Pascasarjana Insitut Pertanian Bogor, Bogor.

Heldman, D.R. and Lund, D.B. 1992. Handbook of Food Engineering. Marcel Dekker, Inc.

Labuza, T.P. 1984. Moisture Sorption : Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul Minnesota.

Labuza, A.Kaanane and J.Y. Chen 1985. Effect of Temperature on The Moisture Sorption, Isotherm

and Water Activity Shift to Two Dehydrates Foods. Journal Food Science (50) : 385-391.

Muterjemi, Y. 1988. A Study of Some Physical Properties of Water in Foodstuff. Doctoral Dissertasion, Division of Food Engineering, Lund University, Sweden.

Pratiwiningsih, I. 2004. Kajian Sifat Fungsional, Mikrostruktur, dan Pendugaan Umur Simpan Surimi Kering Dari Ikan Marlin (*Makaira* sp). Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Rizvi, S.S.H. 1995. Thermodynamic Properties of Food in Dehydration. Dalam M.A. Rao and Rizvi, S.S.H. (eds). Engineering Properties of Foods. Marcel Dekker, New York.

Rockland, L.B. 1969. Water Activity and storage stability. Food Technology. 23 : 1241-1251.

Soekarto, S.T. 1978. Pengukuran Air Ikatan dan Peranannya pada Pengawetan Pangan (Bound Water Determination and its Significance to Food Preservation). Bulletin Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, 4: 4-18.

Van den Berg, C. 1986. Vapour sorption equilibria and other water-starch interaction; a physicochemical approach. Doctoral thesis, Agricultural University, Wageningen.

Van den Berg, C and Bruin, S. 1981. Water Activity and its Estimation in Fopd Systems : Theoretical Aspects. Dalam Water Activity : Influences in Food Quality. Rockland, L.B and Steward, G.F. (ed). Academic Press. London.

Wulandari, N. 2002. Analisis Pengerinan Absorpsi dengan Kapur Api pada Pengerinan Lada Hitam. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Application of Cluster Variables and Factor Analysis in Al (III) sensor using PAN sol gel film entrapment

Rita Sundari¹⁾, Musa Ahmad²⁾, Lee Yook Heng³⁾

School of Chemical Science and Food Technology
Faculty of Science and Technology, National University of Malaysia,
43600 Bangi, Selangor, Malaysia

¹⁾ ritsun2003@yahoo.com ; ²⁾ andong@pkriscc.ukm.my ; ³⁾ leeyokeheng@yahoo.co.uk

Abstract

This is a novel study about the application of multivariate analysis in terms of clustering variables and factor analysis to determine factors affecting error index in terms of learning rate, training cycles and hidden neuron which are key variables in order to minimize error index in neural network training. The case study used in this network training is related with Al (III) sensor employing 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) doped in sol gel film based on fluorescence measurement. A 6.1 version Matlab toolbox has been used to conduct the feed forward network training with back propagation technique. Using the sorted rotated loadings under varimax rotation, the results show good performance in error index display in terms of 0.0005 learning rate, 3000 training cycles and 25 hidden neurons. The invention can be used as a noteworthy contribution to chemometric application combined with optochemical sensor.

Keywords: cluster variables; factor analysis; error index; network training

1. Introduction

Current days the involvement of chemometrics in analytical chemistry has been a topic of growing interest. Earlier papers reviewed in broad spectrum the role of principal component analysis (PCA), partial least square (PLS) regression and multivariate image analysis as versatile tools in spectroscopy, electrochemistry and imaging analysis (Geladi et al., 2004, 2003, 1995, 1992). Zbytniewski & Buszewski (2004) used multivariate techniques in the study of compost maturation derived from sewage sludge. Gan et al., (2005) employed score plot analysis in PCA for characterization of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose. Multivariate calibration has also been used in spectrophotometric determination of maltol and vanillin in foods (Ni et al., 2005). Shya (2001) applied PCA and DA (discriminant analysis) for taste sensing in beverages.

Regarding these valuable applications in chemometrics, this preliminary approach has made several attempts in applying cluster

variables and factor analysis as a part of multivariate method in key factors displaying the error index progress in terms of learning rate, training cycles and hidden neurons in neural network training. The case study has been taken from the response of Al(III) sensor based on fluorescence measurement of doped 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) in sol gel film.

2. Experimental

A 6.1 version Matlab toolbox has conducted the network training executed under a PC-Intel Celeron processor with 128 MB of RAM. Typical training time for 2000 training cycles (epochs) is taken approx. a minute and the operational setting is tabulated in Table-1. A dip coating technique has been used for PAN entrapped in sol gel film. The fluorescence measurements have been carried out under an FL Winlab software applying a Perkin Elmer luminescence spectrophotometer model LS 55.

The cluster variables and factor analysis have been executed under Minitabs release 13.20

Table-1
The operational setting for network training

Parameter	Value
Frequency of progress display (in epoch)	500
Range of training cycle (epoch number)	1000 – 3000
Error goal	0.1
Learning rate (lr)	0.0001 - 0.001
Number of hidden neuron	3 - 30

Table-2. The characteristics of data groups used for cluster variables.

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	L	M	N	K
lr	0.001	0.001	0.001	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
epoch	1000	1000	1000	1000	2000	2000	2000	2000	3000	3000	3000	3000
neuron	30	3	25	7	25	7	30	3	30	3	25	7
1	10.50	16862	21.05	619	14.01	94.79	12.41	2001	5.25	2648	4.25	109.27
2	13.68	80255	12.29	886	13.14	105.24	8.41	1942	6.71	5145	5.80	172.56
3	8.92	19062	19.63	516	12.23	95.17	8.24	1964	4.78	3162	6.64	63.77
4	13.68	16089	14.78	463	24.41	120.26	11.83	2041	5.88	14084	5.43	57.75
.....
11	14.37	18841	7.85	1232	11.74	101.44	12.81	2105	9.67	11954	8.80	62.93
12	6.95	4647	25.82	1078	8.63	110.99	16.81	2003	5.34	13830	6.62	207.70
13	13.70	5080	11.66	1069	16.61	118.94	18.42	1900	6.16	5118	8.11	71.92
14	22.09	6050	8.59	1591	25.71	100.28	22.82	2136	4.72	3635	4.64	80.10
15	11.41	16854	6.16	910	17.82	100.04	17.73	2000	5.00	4790	3.68	85.64

software. The matrix of data groups (Table-2) have been simulated under amalgamation steps with average linkage in cluster variables. After processing by cluster variables, the reduced groups have been algorithm simulated under sorted rotated loadings using varimax rotation with maximum likelihood factor analysis.

3. Results and discussion

Fig.1 displays the error index progress which presented by typical smooth convergence performances executed under 0.0001 learning rate, 2000 epochs and for respective 3, 7, 25 and 30 hidden neurons. The display results expressed as error index data shown in Table-2 have been used in cluster analysis.

Table-3 shows the output data of the cluster variables with average linkage method and displayed in a dendrogram (tree diagram) illustrated in Fig.2. From the final partition (Table-3) the original 12 groups are compressed to 5 groups which further examined by factor analysis.

The selected five groups (A,C,G,L and N) are based on their low error index values in order to meet the network training target and all are

likely to possess higher hidden neuron numbers. In this factor analysis, as we can see from the scree plot (Fig.3) only two components are suitable to be extracted based on their eigen values. From the loading plot (Fig.4) groups C and G are dominant to the learning rate factor, while the other three groups (A, L and N) are likely to the epoch factor. The so-called epoch factor is respect to higher epoch numbers in the dominant group L, while the so-called learning rate factor corresponding to group C.

From Table-4, the varimax rotation is used in order to ensure that the resulting factors are uncorrelated (Kallithraka *et al.*, 2001), while the sorted rotated loadings are taken in order to obtain more accurate results. In this study, the factor analysis has been taken in order to estimate the effect of learning rate, epoch and hidden neuron on error index contributing by selected groups and to measure the variance within each selected group.

In Table-4, the highest value in factor 1 (sign neglected) is contributed by group G, while group L is dominating in factor 2. This information indicates that the two groups (G

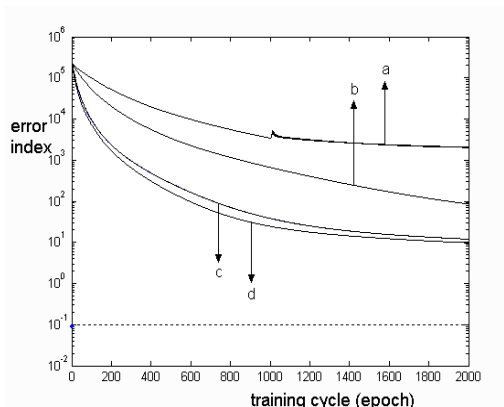


Fig.1 The progress display of error index under 2000 epoch with lr 0.0001 at different number of hidden neuron, i.e. (a)3, (b)7, (c)25, (d)30

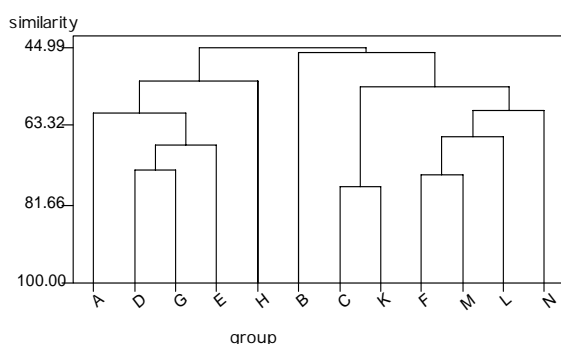


Fig.2 A tree-diagram (dendrogram) for error index among grouping data. based on similarity in squared Euclidean distance

Table-3. The output of cluster variables and its final partition.

Cluster Analysis of Variables: A, B, C, D, E, F, G, H, L, M, N, K Correlation Coefficient Distance, Average Linkage Amalgamation Steps					
Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	Final partition
1	11	77.42	0.452	C – K	Cluster 1 A – D – E – G Cluster 2 B Cluster 3 C – K Cluster 4 F – L – M – N Cluster 5 H
2	10	74.70	0.506	F – M	
3	9	73.50	0.530	D – G	
4	8	67.77	0.645	D – E	
5	7	65.96	0.681	F – L	
6	6	60.17	0.797	A – D	
7	5	59.70	0.806	F – N	
8	4	54.11	0.918	C – F	
9	3	52.75	0.945	A – M	
10	2	46.20	1.076	B – C	
11	1	44.99	1.100	A – B	

and L) are the potential contributors to give effect in error index. On the contrary, the lowest value in factor 2 contributed by group C (G excluded) is an indication of stability in the error values, and group N taken the second

position from the lowest value (factor 2). From the term of network training, the stability factor is more important, thus group C is one to be chosen. However, the training target prefers to choose group N on account of very low noise,

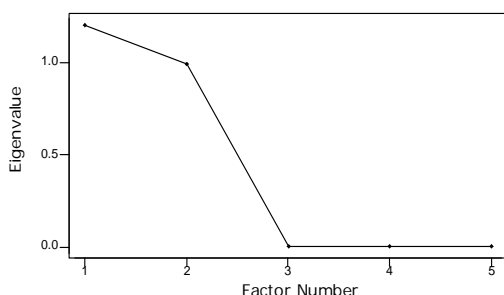


Fig.3 The extracting factors based on eigen value

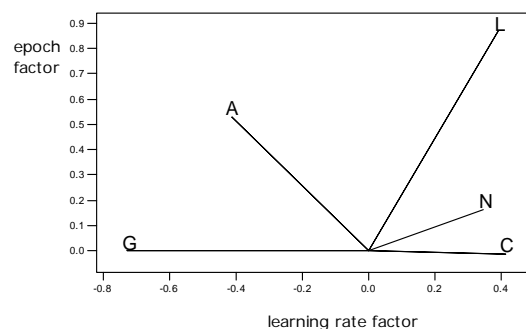


Fig.4. Loading plot of extracted data group

Table-4. Typical characteristics of factor analysis after clustering.

Factor Analysis: A, C, G, L, N Maximum Likelihood Factor Analysis of the Correlation Matrix Varimax Rotation Sorted Rotated Factor Loadings		
Variable (group)	Factor 1	Factor 2
G	- 0.727	0.001
L	0.389	0.866
A	- 0.415	0.532
N	0.343	0.164
C	0.410	- 0.011
Variance	1.1381	1.0609
% Var	0.228	0.212

while group C is highly noised due to higher learning rate. The factor analysis can not estimate the degree of noisy in the progress display of error index. In another view in term of degree of effects on error index, the group L is the most inducer on error index effect followed by group G regarding their factor values (Table-4). Further examination on these two groups (L and G) as indicated in Table-2 shows that the higher epoch number and higher learning rate which belongs to group L is suspected to the source of instability.

4. Conclusion

In this study, the cluster variables and factor analysis show moderately good implementation in the role of key factors (hidden neuron, training cycle and learning rate) in network training contributing to error index progress. The use of PAN doped in sol gel film for an Al (III) sensor based on its fluorescence characteristic can be viewed as a novel invention both in sol gel technology as well as optochemical sensor.

5. Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the School of Chemical Science and Food Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, and Malaysia Ministry of Science and Innovation (MOSTI) for funding this work under top-down IRPA 09-03-03-0006 research grant. Dr. Rita Sundari would like to thank University of Trisakti, Jakarta, for permission to this research attachment program.

6. References

- Gan H.L., Man Y.B.C., Tan C.P., Noraini I., Nazimah S.A.H., (2005). Characterization of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose, *Food Chem.*, **89**(4), 507-518.
- Geladi P., Sethson B., Nystrom J., Lillhonga T., Lestander T., Burger J., (2004). Chemometrics in spectroscopy. Part 2. Examples, *Spectrochim. Acta Part B*, **59**, 1347-1357.
- Geladi P., (2003). Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical Chemometrics, *Spectrochim. Acta Part B*, **58**, 767-782.

- Geladi P., (1995). Sampling and local models for multivariate image analysis, *Mikrochim. Acta*, **120**, 211-230.
- Geladi P., Bengtsson E., Esbensen K., Grahn H., (1992). Image analysis in chemistry. Part 1. Properties of images, greylevel operations, the multivariate image, *TRAC*, **11**, 41-53.
- Kallithraka S., Arvanitoyannis I.S., Kefalas P., El-Zajouli A., Soufleros E., Psarra E., (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin, *Food Chem.*, **73**(4), 501-514.
- Ni Y., Zhang G., Kokot S., (2005). Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks, *Food Chem.*, **89**(3), 465-473.
- Shya T.J. (2001). *Penderia Rasa Pakai Buang: Alatan Analisis Baru berasaskan Penderia Global dan Pengecaman Pola*. Master Thesis, Department of Chemistry, Science University of Malaysia.
- Zbytniewski R. & Buszewski B., (2004). Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 2: multivariate techniques in the study of compost maturation, *Bioresour Technol.*, (in press).

Electrooxidation Of Ethanol To Acetic Acid On Platinum Wire Electrodes

Riyanto, Mohamed Rozali Othman, Jumat Salimon

Electrosynthesis Laboratory, School of Chemical Sciences and Food Technology,
Faculty of Sciences and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia,
43600, Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Abstract

The electrooxidation of ethanol to acetic acid in alkaline (0.1 M KOH) and acid (1.0 M HClO₄) has been studied on platinum wire electrodes. The electrochemical study by cyclic voltammetry (CV) in different concentrations of ethanol and electrolyte (alkaline and acid). In this research potential range oxidation of ethanol from 600-1065 mV in 0.1 M KOH and 700-1125 mV in 1.0 M HClO₄. Reaction yields of acetic acid and acetaldehyde was detected by high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: Ethanol, Platinum wire, Acetic acid, Electrooxidation, Product analysis

1. Introduction

Acetic acid is an important industrial commodity chemical, with a world demand of about 6 million tons per year and many industrial uses. The primary use of this chemical is in the manufacture of assorted acetate esters, fungicide and as a solvent for many organic compounds, the preparation of pharmaceuticals (aspirin), cellulose acetate for film and plastic goods, perfumes, synthetic fiber (Wittcoff and Reubeun, 1996).

The first methanol to acetic acid carbonylation process was commercialized in 1960 by BASF. It used an iodide promoted cobalt catalyst and required very high pressures (600 atm) as well as high temperature (230°C), but gave acetic acid in ca. 90% selectivity. The production of acetic acid by the Monsanto process is alkalined on a rhodium catalyst and operates at a pressure of 30-60 bar and temperature of 150-200°C. The process gives selectivity of over 99% alkalined on methanol. The production of acetic acid using the iridium catalyst system has been commercialized in 1996 by BP-Amoco as the "CativaTM" process (Thomas and Fink, 2003). Synthesis of acetic acid by direct oxidation of ethylene alkalined catalysts was studied (Wang et al., 2002).

Process of Monsanto still used for the production of acetic acid from methanol. Process Monsanto can be told process using reaction of ordinary chemistry or organic synthesis conventionally. Process this have many weakness, in consequence proposed by production process of acetic acid with electrochemical or more knowledgeable by the name of electrosynthesis. Most important among the advantages of electrosynthesis is the very wide range of oxidation and reduction reaction possible. Other advantages that may be realized are: significantly less energy requirement, less hazardous process, elimination or minimization of polluting by products requiring disposal, the possibility of reaching very high levels of product purity and selectivity, considerably improved capital and operating cost over conventional methods (Weinberg, 2002).

Recently, a new electrooxidation of ethanol for application in fuel cells system and study electrochemical oxidation of ethanol was developed (Camara, et al. (2004); Tripkovic, et al. (2001); Schmidt and Ianniello, (1996); Iwasita, et al. (1993); Chang, et al. (1990); Tarasevich, et al. (1990). This kind of investigations may probably lead to the design of catalyst for an effective oxidation of such organic molecule and therefore its use as a fuel

for low temperature fuel cells. Nevertheless, in spite of an incomplete oxidation, the use of ethanol can be of advantage because such oxidation products can be, depending on the reaction conditions, either acetaldehyde or acetic acid. These products possess a high commercial interest. Its drawbacks are that ethanol is not easily evaporated at room temperature and not readily oxidized (Liao, et.al. 2004). Its non toxicity and its availability from biomass resources advocate (Lamy, et.al. 2004).

Research about ethanol electrooxidation for cell fuel and study mechanism reaction have done many, but research of ethanol electrooxidation for the electrosynthesis of acetic acid have never been done. In this work we studied the ethanol electrooxidation to acetic acid on platinum wire electrodes in alkaline and acid medium. Platinum (Pt) is known as an inert metal with a strong catalytic for many electrochemical reactions. Many components can be adsorbed on Pt surfaces and the adsorption of hydrogen is a well known phenomenon in electrochemistry. In this connection, the effect of electrolyte, time electrolysis, concentration ethanol and potential. These products were also confirmed by HPLC.

2. Experimental

Solution and instrumentation

All solution were prepared with deionised water and analytical grade (Merck) chemicals. 1.0 M HClO₄ and 0.1 M KOH was used as supporting electrolyte. Nitrogen were used to deareate the solutions and to keep an air free atmosphere over the solution during 10 min. Ethanol solutions were prepared by dilution of absolute ethanol (BDH laboratory supplies) with deionised water.

A model PGZ 402 Universal Pulsa Dynamic EIS, Voltammetry, Voltalab potentiostat was used for electrochemical measurements and data acquisition was accomplished by using the Voltmaster 4 software. Voltammetric experiments were done in a three electrode cell using a platinum wire working electrode, a Ag/AgCl (saturated KCl) or SCE reference electrode and a platinum wire as a counter electrode. All the potentials are given with respect to the SCE reference electrode.

Analyses were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) equipment composed of a pump (Waters 1515 Isocratic HPLC Pump), a column (C18) and two detectors an UV-visible detector (Waters 2487, Dual λ Absorbance detector) and a differential refractometer set on line. Chromatograms were recorded and integrated by an integrator-calculator (Merck-Hitachi D-2500). All experiments were carried out at room temperature. The mobile phase of acetonitrile in 0.1% H₃PO₄ was applied during 5 min.

Experimental procedure

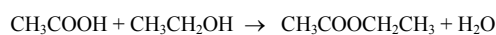
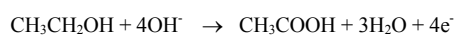
Electrolysis was performed in a solution of 0.5 M ethanol in 0.1 M KOH or 1.0 M HClO₄, at room temperature. The electrochemical study by cyclic voltammetry (CV) and oxidation of ethanol by steady state potentiostatic method was performed in a polyethylene cell with a platinum wire counter and working electrodes. The potential of the working electrodes as measured against a SCE reference electrode. Electrolysis samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

3. Result and discussion

Oxidation of ethanol in alkaline medium

Before running the electrolysis, cyclic voltammetry was used to check the reactivity of ethanol on platinum wire in two different media, perchloric acid and potassium hydroxide. The voltammograms allowed a choice of the convenient potential range to obtain a suitable rate of oxidation. Fig. 1a-1b. presents the voltammograms of a platinum wire electrode in ethanol. Fig. 1a. presents the voltammograms of a platinum wire electrode in ethanol with 0.1 M KOH and Fig. 1b. presents the voltammograms of a platinum wire electrode in supporting electrolyte 0.1 M KOH (without ethanol).

From Fig. 1a. seen that oxidation of ethanol at potential range -250 mV until 1600 mV there are two peaks. First peaks at area 600-1065 mV. This peaks designate process oxidation from ethanol follow the following reaction mechanism by Periera, et.al. (2004) and Filho, et.al. (1998):



From reaction of above ethanol electrooxidation will yield acetic acid and of ethyl acetate. Process forming of acetic acid

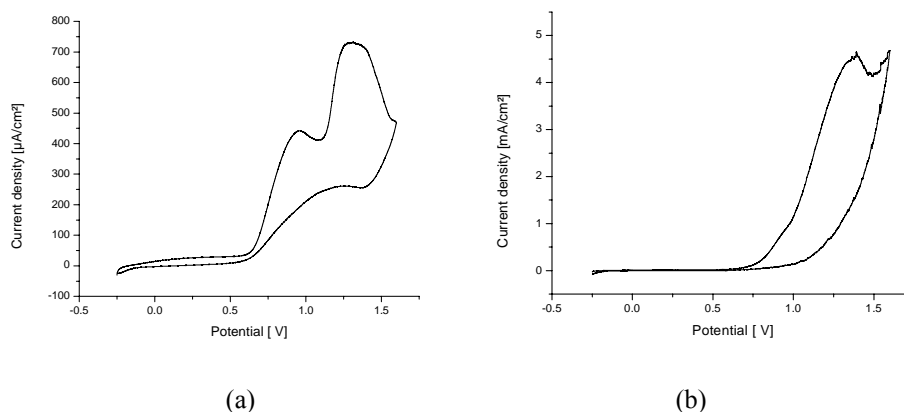


Fig. 1. Cyclic voltammograms for platinum wire electrode in 0.1 M KOH 5.0 mL + 0.5 M ethanol 45.0 mL (a) and 0.1 M KOH (b). Scan rate: 10 mVs⁻¹. Electrode surface area 1.0 cm².

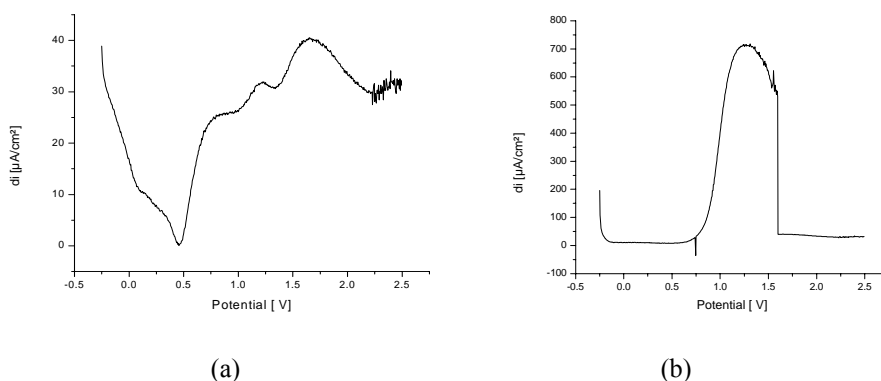
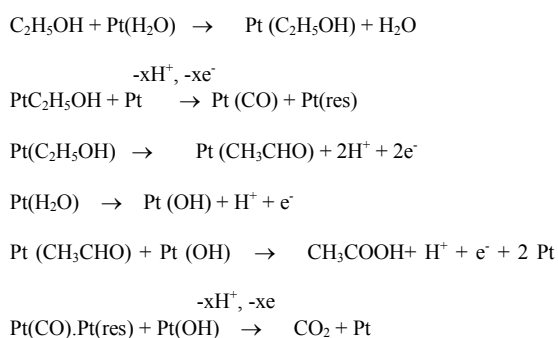
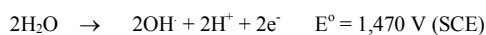


Fig. 2. Potential squares for platinum wire electrode, up to the following positive potential limits 2500 mV in (a) 0.1 M KOH 5.0 mL + 0.5 M ethanol 45.0 mL (b) 0.1 M KOH 5.0 mL. Scan rate: 50 mVs⁻¹. Electrode surface area 1.0 cm².

told by Xia, et.al. (1997), passing mechanism reaction on the surface of electrode of Pt the following:



For second peaks (Fig 1a.) there are at area 1100-1600 mV, this peaks represent area oxidize from H₂O with the following reaction:



Oxidation process have to be ascertained to happened at ethanol, this matter is conducted by special CV for electrolyte (0.1 M KOH)

and seen at Fig. 1b. At Fig 1b. seen there no peaks at area 600-1065 mV of current density very high. Of data above can be used by electrolysis reference with Chrono Coulometry (CC) to know product oxidation of ethanol that is done at area 600-1065 mV. To support cyclic voltammograms needed by potential squares curve, because possibility there is too low peaks like at CV of ethanol with KOH.

At Fig. 2. Potential squares with limit potential 2500 mV. Fig 2a. seen clearly there are three peaks at potential above 500 mV. Peaks 1 at potential 600 mV, second peaks at potential 1100 mV and third peaks at potential 1400 mV. This peaks seen clearly if compared with CV (Fig. 1b.), this matter because big enough water concentration. Potential squares oxidation of ethanol happened at peaks 1 and 2 with area of around 500-1100 mV. Fig. 2b. potential squares for KOH showing inexistence culminate at area

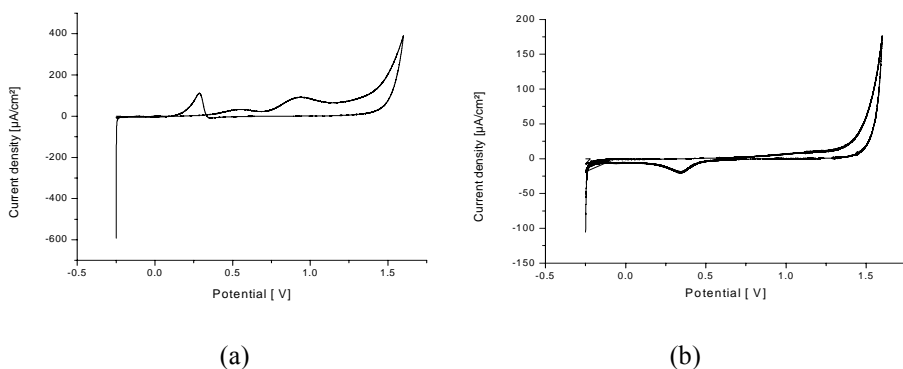


Fig. 3. Cyclic voltammograms for platinum wire electrode in 1.0 M 5.0 mL HClO₄ + 0.5 M 45.0 mL ethanol (a) and 1.0 M HClO₄ (b). Scan rate: 10 mVs⁻¹. Electrode surface area 1.0 cm²

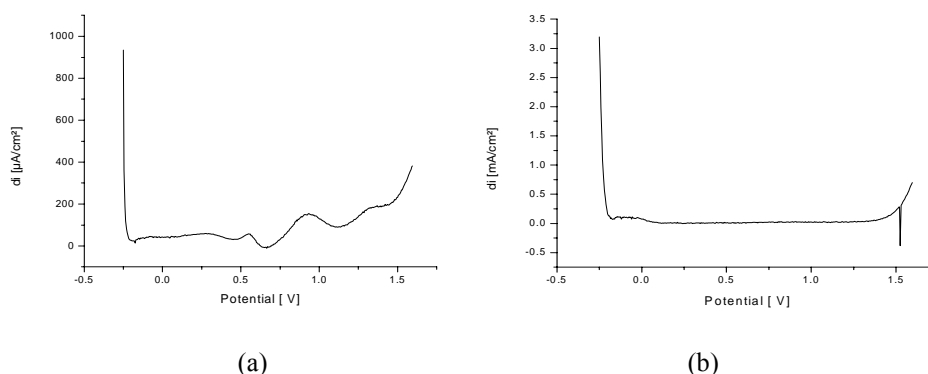


Fig. 4. Potential squares for platinum wire electrode, up to the following positive potential limits 1500 mV in (a) 1.0 M HClO₄ 5.0 mL + 0.5 M ethanol 45.0 mL (b) 1.0 M HClO₄ 5.0 mL. Scan rate: 50 mVs⁻¹. Electrode surface area 1.0 cm²

500-1100 mV. This matter show only happened oxidation at water.

Oxidation of ethanol in acid medium

Potential oxidation of ethanol at yielded by acid medium of curve form which is very differ from CV at alkaline medium, but area oxidation of ethanol much the same to with alkaline medium. CV of ethanol in acid medium can be seen at Fig. 3.

Fig. 3a. there are two peaks which also designate oxidation of water and ethanol with reaction of same at condition of alkaline. For first peaks residing in at area of potential 700-1125 mV and for second peaks residing in at bigger potential 1125 mV. Fig. 3b. representing cyclic voltammograms of electrolyte 1.0 M HClO₄. There are difference between of alkaline medium and acid medium, of alkaline medium bigger density current compared to at acid medium.

Low peaks at CV of ethanol in acid complicate to determine oxidation area. Curve of potential

squares can be used to assist to determine potential oxidation of ethanol. Curve of potential squares can be seen at Fig. 4. From Fig. 4a. seen peaks which is equal to CV of ethanol at acid medium of area is oxidation of ethanol happened at potential 600-1100 mV and irrigate happened at potential above 1300 mV. At Fig. 4b. curve of potential squares for HClO₄ to show there no peaks oxidation ethanol at area 600-1100 mV.

Scan rate effects

One of the way of to clarify oxidation area can be done by boosting up scan rate. Scan rate effect can be seen at Fig. 5. Fig. 5a-d. seen excelsior of excelsior scan rate culminate and excelsior of current density so that area oxidation of ethanol progressively looked to be. From Fig. 5. suggested to use big scan rate between 100-250 mVs⁻¹ if will determine oxidation area. Besides its clear peaks looked to be, analysis time become quickerly. At Fig. 5. The higher the scan rate, the bigger the peaks.

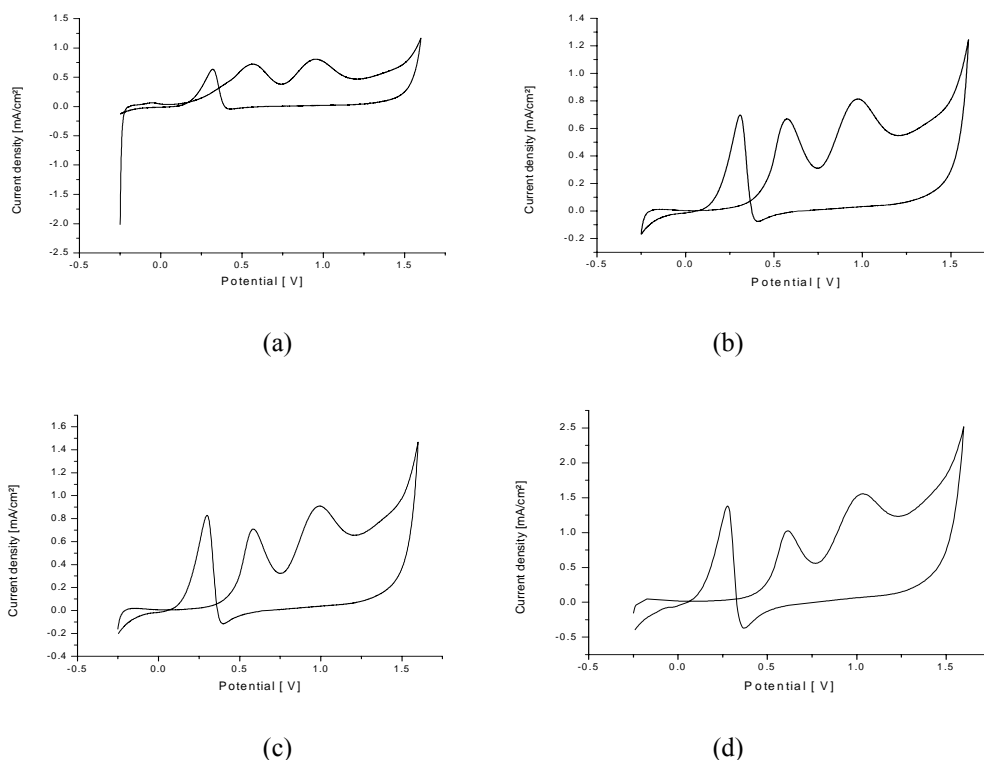


Fig. 5. Scan rate effect on cyclic voltammograms for platinum wire electrode in 1.0 M HClO₄ 2.0 mL + 0.5 M C₂H₅OH 25.0 mL (a) Scan rate: 50 mVs⁻¹ (b) Scan rate: 100 mVs⁻¹ (c) Scan rate: 150 mVs⁻¹ and (d) Scan rate: 250 mVs⁻¹. Electrode surface area 1.0 cm²

Table 1. Reaction yields of acetic acid obtained by the HPLC analysis of the electrolysis (E = 1065 mV) experiments of 0.1 M KOH 2 mL + 0.5 M C₂H₅OH 25 mL. Electrode surface area 1.0 cm²

Electrolysis time (minit)	Reaction yields (acetic acid %)	
	0.1 M KOH	1.0 M HClO ₄
15	-	-
30	7.83	2.37
120	30.21	8.99
240	49.22	17.24

Ethanol oxidation products

According to some researcher oxidation of ethanol will yield acetic acid, and acetaldehyde are most probable oxidation products of ethanol [Pereira, et.al, (2004); Xia, et.al, (1997); Filho, et.al., (1998); Iwasita and Pastor, (1993); Iwasita, et.al. (1989). Product oxidation of ethanol depend on some factor like, electrode type, wide of electrode, concentration of ethanol, electrolysis time, solution pH, electrolyte type and voltage. At this paper is showed by product oxidation of ethanol at various variation of electrolyte type and time at Table 1.

At Table 1. acetic acid start to be formed by when electrolysis 30 minute. Electrolysis time 15 minute not yet been formed by acetic acid,

because the happening of phase of adsorption of ethanol on the surface of electrode (Xia, et.al, 1997), besides volume and concentration of ethanol which is big to be compared to wide electrode. At Table 1. seen that longer ever greater electrolysis of yielded acetic acid. If electrolysis to continue hence ethanol will finished turn into acetic acid and other compound like and acetaldehyde. The duration electrolysis time very depend on wide of surface of electrode medium of alkaline better to yield acetic acid compared to at condition of alkaline because to the happening of acetic acid according to reaction of told by Xia, et. al. (1997) needed OH or medium of alkaline. To increase result of acetic acid require to be

conducted by electrolysis with surface of broader electrode and other optimum condition.

4. Conclusions

The electrochemical oxidation of ethanol on platinum electrode in 0.1 M KOH and 1.0 M HClO₄ was evaluated. Potential oxidation of ethanol in 0.1 M KOH at range 600-1065 mV. Potential oxidation of ethanol in 1.0 M HClO₄ at range 700-1125 mV. From these cyclic voltammetry experiments, the potential program suitable for prolonged electrolyses was chosen at 1065 mV. Concentration effects at cyclic voltammograms is ever greater of concentration progressively go up density current and will not influence area range of potential oxidation of ethanol. According to result of HPLC analysis of longer ever greater electrolysis time of formed acetic acid. Alkaline medium compared to good of acid medium to yield acetic acid.

6. References

- Camara, G.A., de Lima, R.B., Iwasita, T., (2004). Catalysis of ethanol electrooxidation by PtRu: the influence of catalysts composition, *Electrochemistry Communications*, (6), 812-815.
- Chang, S.C, Leung, L.W.H. and Weaver, M.J., (1990). Metal crystallinity effects in electrocatalysis as probed by real time FTIR spectroscopy: Electrooxidation of formic acid, methanol and ethanol on ordered low index platinum surfaces. *J. Phys. Chem.* (94), 6013-6021.
- Filho, G.T., Gonzalez, E.R. Motheo, A.J. Belgsir, E.M. Leger, J.M., Lamy, C., (1998). Electrooxidation of ethanol on gold: analysis of the reaction products and mechanism, *J. Electroanal. Chem.* (444), 31-39.
- Iwasita, I. Dalbeck, R. Pastor, E. and Xia, X., (1993). Progress in the study of electrocatalytic reaction of organic species. *Electrochimica Acta.* (39), 1817-1823.
- Iwasita, I. and Pastor, E., (1993). A dems and FTir spectroscopic investigation of adsorbed ethanol on polycrystalline platinum. *Electrochimica Acta.* (39), 551-537.
- Iwasita, I. Rasch, B. Catteneo, E, and Vielstich, W., (1989). A snifters study of ethanol oxidation on platinum. *Electrochimica Acta.* (34), 1073-1079.
- Lamy, C., Rousseau, S., Belgsir, E.M., Countanceau, J.M., and Leger, (2004). Recent progress in the direct ethanol fuel cell development of new platinum-tin electrocatalysts, *Electrochim. Acta.* (49), 3901-3908.
- Liao, S., Linkov, V., and Petric, L., (2004). Anodic oxidation of ethanol on inorganic membrane alkalined electrodes, *Applied Catalysis*, (258), 183-188.
- Pereira, M.G. Jimenez, M.D. Elizalde, M.P. Robledo, A.M. and Vante, N.A., (2004). Study of the electrooxidation of ethanol on hydrophobic electrodes by DEMS and HPLC. *Electrochim. Acta.* (49), 3917-3925
- Schmidt, V.M. and Ianniello, R., (1996). Electrochemical reactivity of ethanol on porous Pt and PtRu: Oxidation/reduction reaction in 1 M HClO₄. *J. Phys. Chem.* (100), 17901-17908.
- Tarasevich, M.R, Karichev, Z.R., Bogdanovskaya, V.A, Lubnin, E.N., and Kapustin, A.V., (2005). Kinetics of ethanol electrooxidation at RuNi catalysts, *Electrochemistry Communications*, (7), 141-146.
- Thomas, C.M. and Fink, G.S., (2003) Ligand effects in the rhodium-catalyzed carbonylation of methanol, *Coor.Chem.Rev.* (243), 125-142.
- Tripkovic, A.V., Popovic, K.D. and Lovic, J.D., (2001). The influence of the oxygen containing species on the electrooxidation of the C1-C4 alcohols at some platinum single crystal surfaces in alkaline solution, *lectrochim. Acta.* (46), 3163-3173.
- Wang, X. Fang, K. Zhang, J. and Cai, T., (2002) Synthesis of acetic acid on Pd-H₄SiW₁₂O₄₀ alkalined catalysts by direct oxidation of ethylene. *J. Natural Gas Chem.* (11), 51-56.
- Weinberg, N.L., (2002). Industrial organic electrosynthesis with some advice on approaches to scaleup. *Electrochemistry encyclopedia.* New York.
- Wittcoff, H.A. Reubeun, B.G., (1996). Industrial organic chemical. New York. A-wiley intersciences publication.
- Xia, X.H. Liess, H.D. and Iwasita, T., (1997). Early stages in the oxidation of ethanol at low index single crystal platinum electrodes, *J. Electroanal. Chem.* (437), 233-240.

Carbonitriding Of AISI 316 By Microwave Plasma Enhanced Chemical VAPOUR Deposition Process

R.J. Talib, A.H. Hashim, J.J. Mohamed, M.S. Shaari, M.A. Hamid

AMREC, SIRIM Bhd., Lot 34, Jalan Hi-Tech 2/3
Kulim Hi-Tech Park, 09000 Kulim, Malaysia
Email: talibria@sirim.my

Abstract

A commercial AISI 316 stainless steel was used as a substrate in this plasma carbonitriding process using microwave plasma enhanced chemical vapour deposition (MPECVD) technique. The substrates were subjected to four-difference methane, nitrogen, hydrogen ratios of 89:1:10, 88:2:10, 87:3:10, 86:4:10. The other coating parameters such as microwave power, deposition times and chamber pressure were kept constant throughout this study. The effects of nitrogen, methane, hydrogen ratio on the hardness, tribological and morphological characteristics on the carbonitrided samples were investigated using a pin-on-disk tribometer, atomic force measurement (AFM), and scanning electron microscopy (SEM). Test results showed that the nitrogen, methane and hydrogen ratio of 90:3:7 gives the best mechanical and tribological characteristics on the carbonitrided specimens.

Keyword: plasma carbonitriding, AISI 316, MPECVD, AFM, SEM

1. Introduction

Stainless steels are widely used in the chemical, food industries, and vacuum moulding tool owing to their excellent corrosion resistance and resist oxidation at high temperature, but have a low wear resistance, hardness and poor tribological characteristics. This limits their usage in some of the engineering component applications. The plasma nitriding and carbonitriding process are used to increase the hardness and reduce wear effect in stainless steel material. Plasma carbonitriding is thermochemical processes where methane and nitrogen is introduced into the deposition chamber. This process is commonly used for improving surface mechanical and chemical properties such as hardness, wear resistance, and anti scuffing characteristics ¹⁾. Plasma carbonitriding process introduces more and faster nitrogen and carbon diffusion into the substrate, thus allows shorter diffusion times and lower temperatures.

Nitriding or carbonitriding at temperature above 450 °C can result in formation of CrN or CrC on the substrate surface, which binds

chromium from the solid solution, thus lowering the corrosion resistance of the sample ²⁾. Borges et al (2000) postulated that by introducing a large amount of hydrogen or small amount of acetylene during plasma process can reduced the chromium precipitation, thus improves the corrosion resistance ¹⁾. The carbonitrided layer is more useful than carburizing treatment for steel which is subject to wear ³⁾ and also exhibits a corrosion resistance better than pure nitrided and carburized layers ⁴⁾. The aim of this investigation was to study the effect of methane, nitrogen, hydrogen ratio on the hardness, tribological and morphological characteristics of the carbonitrided samples.

2. Experimental

A commercial stainless steel posses of the following composition (wt. %): C, 0.7; P, 0.03; S, 0.05; Mn, 1.38; Cr, 15.48; Mo, 1.79; V, 0.09; Si, 0.39; Ni, 9.68; Fe, balance was used in this study. The samples were marked as A, B, C, and D corresponding to different methane, nitrogen, and hydrogen ratio as shown in Table 1. Other process parameters were kept constant

Table 1. Sample marking

Sample	Methane (%)	Nitrogen (%)	Hydrogen (%)
A	1	89	10
B	2	88	10
C	3	87	10
D	4	86	10

Table 2. Carbonitriding parameters

Parameters	Value
Microwave power	1.5 kW
Frequency	2.45 GHz
Substrate temperature	500 °C
Chamber pressure	1×10^{-4} torr

as shown in Table 2. A coin shape sample with a diameter of 30 mm and 5 mm thick was polished to 6 μm surface finish using SiC emery paper and emery cloth with diamond paste. Prior to the deposition process, the substrate was ultra-sonic cleaned with acetone for 30 minutes for removing any contaminations on the substrate surfaces. The samples were then placed in the deposition chamber of Microwave Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (MPECVD) system for carbonitriding process.

After carbonitriding process, the sample was subjected to microhardness measurement, friction tests, AFM observations and microstructural examinations. A Vickers microhardness tester model AKASHI MVK-E was used to measure the hardness of the sample. The measurement was conducted at 25 gm load using a diamond tip. The tribological characteristics of the sample was evaluated on a pin-on-disc tribometer model CSEM at sliding speed of 3.50 cm/s, distance of 300 m with a load of 10 N and under condition of dry friction. Alumina ball of 6 mm diameter was used as a static partner in this test. The friction coefficient against sliding distance were recorded and then examined for frictional

characteristics.

Sample for AFM measurement was cut to a size of 10 mm \times 10 mm and then ultrasonic cleaned using ethanol for 15 min minutes. The surface morphology on the carbonitrided samples was observed using AFM model Shimadzu. Samples for surface examination were cut from the carbonitrided sample, ultrasonic cleaned using ethanol for 30 minutes. Whereas samples for subsurface microstructure examination were sectioned, mounted polished to a surface finish of 1 μm and etched with Adler etchant. The microstructure of the carbonitrided layer was observed using scanning electron microscopy model LEO 1525.

3. Results and Discussion

Microhardness

Table 3 shows the microhardness of the carbonitrided sample at a load of 25 g. Test results showed that the plasma carbonitriding process had increased the microhardness of the carbonitrided sample depending on nitrogen, methane, hydrogen ratios. The surface microhardness is increased by a factor of more than 2.9 compared to microhardness of untreated sample (207.9 HV). Sample C was the hardest with a reading of 752.2 HV and

Table 3: Microhardness

Sample	Hardness (HV)	Improvement
Substrate	207.9	-
A	600.4	2.9 times
B	706.6	3.4 times
C	752.2	3.6 times
D	642.8	3.1 times

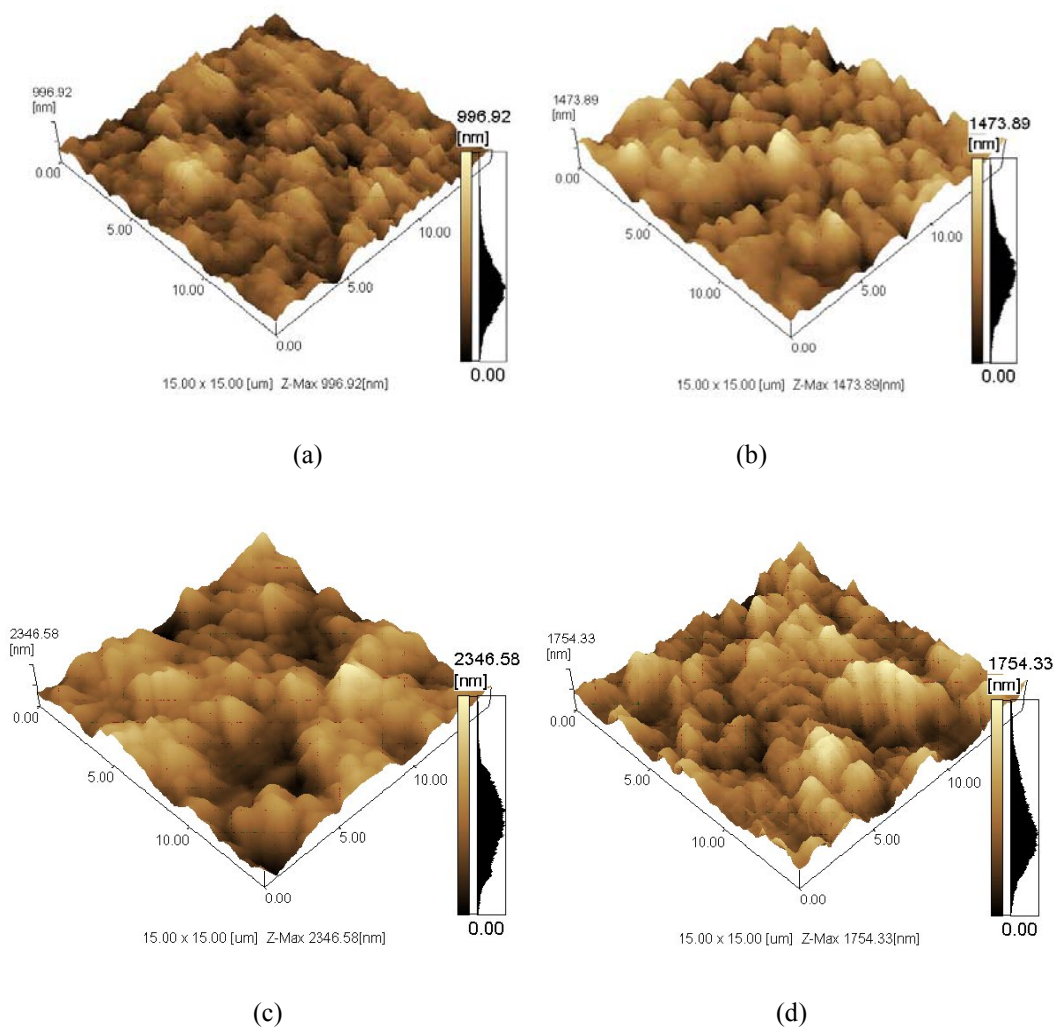


Figure 1. 3D topographic image of AFM under different methane, nitrogen and hydrogen ratios, (a) sample A (b) sample B (c) sample C, (d) sample D.

sample A was the lowest with a reading of 600.4 HV. The microhardness increases with increasing methane gas up to 3 % with a reading of 752.2 HV and then reduces to 642.8 HV when the methane gas increased to 4%. In this process carbonitriding reaction not only occurs at the surface but also in the subsurface region of the specimen owing to diffusion of the N and C atoms into the substrate. This phenomenon resulted in the formation of carbonitrides and nitrides of iron, chromium etc., in stainless steel, thus greatly enhances the surface hardness of the carbonitrided sample.

Surface Roughness

Figure 1 shows 3D surface modulation of the carbonitrided surface obtained by atomic force

microscopy under different nitrogen, methane, hydrogen ratios. The surface roughness properties of the carbonitrided samples show the same trend as the microhardness characteristics when the methane gas ratio increased. Table 4 shows that the surface roughness of the carbonitrided sample becomes rougher with increased methane ratio up to 3 %, and then becomes smoother again when the methane ratio increased to 4%. When the methane and nitrogen ratio of 1:89 was introduced into the chamber (Figure 1a), nitrogen and carbons atoms condense into suitable nucleie site. A strong substrate/ coating atom interaction result in low adatom mobility and a high density of nuclei. This phenomenon produced smaller grain size of the carbonated

layer with smoother surface. As the methane ratio increased up to 3 %, high adatom mobility and ease for the nuclei to spread laterally which increases the formation of pores at the interface (Figure 1a and 1c). Subsequently, increase the surface roughness of the carbonitrided layer. Figure 1d shows the grain size becomes smaller as well as decreases the pores intensity as a result of saturated formation of nitride and carbide.

Table 4: Surface roughness of carbonitrided layer

Sample	Surface roughness Rms (nm)
A	125.1
B	219.8
C	362.4
D	300.4

Microstructure

The microstructure of untreated and carbonitrided samples under different methane, nitrogen and hydrogen ratios is shown in Figure 2. Microstructural examination showed that the N and C have mainly been incorporated into the existing iron lattice as interstitial atoms or as a finely dispersed alloy precipitate into the diffusion layer. Microstructure was changed by the introduction of single interstitial N and C

atoms in solid solution. It was observed that a smaller nitride and carbide grain participates was deposited on the substrate surface when the methane and nitrogen ratio of 1:89 was introduced into the chamber (Figure 2a). As the methane gas increased to 2%, the agglomerate of nitride and carbide participate is formed on the substrate surface. Subsequently, when the carbon ratio increased to 3 %, solubility limit of nitrogen and carbon in the ferritic matrix will be reached, and finally a coherent nitride and carbide precipitates are formed on the carbonitrided layer covering the substrate surface with pores as shown in Figure 3c. When the methane ratio increased to 4%, formation of nitride and carbide is saturated, resulting in the formation of smoother carbonitrided layer (Figure 2d).

Friction and Wear

Test results showed that the plasma carbonitriding process had reduced the friction coefficient (Figure 3). In the early stage of sliding, a static alumina ball was sliding on the carbonitriding layer and the friction coefficient was about 0.2 for sample B, C, and D. Sample A coefficient reading was about 0.3. As the sliding progressed, the carbonitriding layer is started to deteriorate resulting increase in friction coefficient depending on the methane, nitrogen, and hydrogen ratios. In this test, the carbonitriding layer still not damaged even

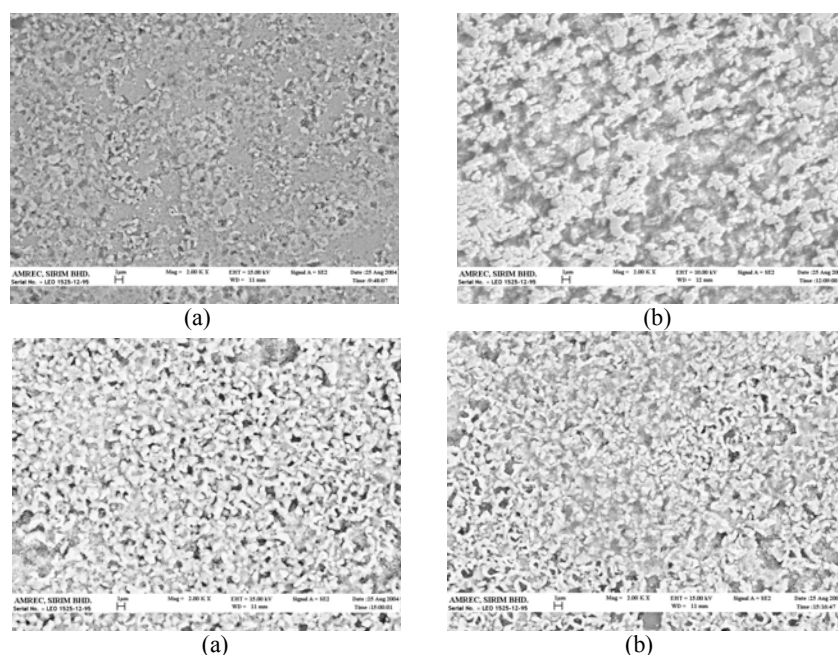


Figure 2. SEM images of plasma carbonitrided under different gas ratio (a) sample A, (b) sample B, (c) sample C, (d) sample D

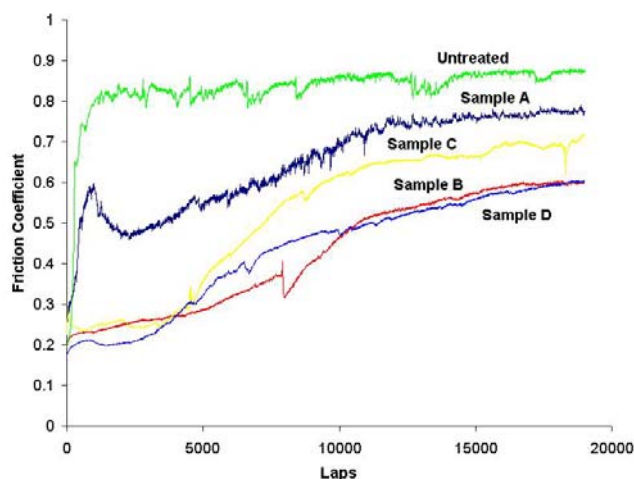


Figure 3: Graph of Friction Coefficient against Sliding Distance

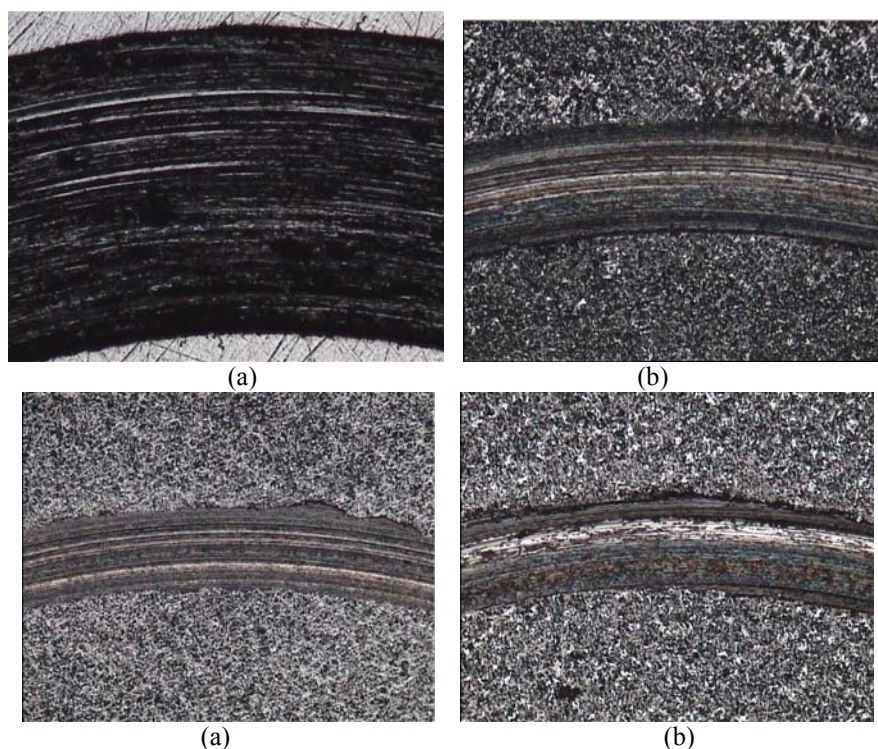


Figure 4. Optical micrographs of worn surfaces: (a) untreated (20x), (b) sample B (20x), (c) sample C (20x), (d) sample D (20x).

after 20,000 laps (300 meters) of alumina sliding on it. If the carbonitriding layer had damaged, the alumina ball will be slid on the untreated surface. The friction coefficient reading shall show a reading of about 0.8, which is the reading of untreated sample as shown in Figure 3. This indicates that the carbonitriding layer had a good adhesion between the carbonitriding/substrate interface and at the same time reduces the friction coefficient.

Based on the hardness (Table 3), surface roughness (Table 4) and friction coefficient (Figure 3) results, it was observed that there is no direct correlation between hardness, surface roughness with the friction coefficient. For example, sample B and sample D had the same trend of friction coefficient even though had different hardness, surface roughness and microstructure.

It can be seen from Figure 4 that the wear track of sample C had the shortest distance compared to the other carbonitrided samples. Figure 4 (a) shows wear track of untreated sample. This show that sample is superior in terms of wear resistance even though had higher hardness and friction coefficient. Based on the above observations, it could be concluded that samples C with a methane, nitrogen and hydrogen ratio of 90:3:7 gives the best results.

4. Conclusions

In this study, the following phenomena could be concluded as follows;

- hardness and the surface roughness of the carbonitrided layer are depending on the methane, nitrogen, and hydrogen ratios.
- carbonitriding layer reduces the friction coefficient, but the rate of reduction is depending on the methane, nitrogen, and hydrogen ratios.
- Based on the test results, it could be concluded that the methane, nitrogen and hydrogen ratio of 90:3:7 gives the best mechanical and tribological characteristics on the carbonitrided specimens.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to the Government of Malaysia for funding this research project through IRPA grants 05-09-0101-0032. The assistance of Muhd Hazri Othman for deposition process and Mohd Amin Morat for SEM are also appreciated.

6. References

1. Borges, C. F. M., Hennecke, S., and Pfender, E. (2000). Decreasing chromium precipitation in AISI 304 stainless steel during the plasma-nitriding process *Surface and Coatings Technology*, **123** (2-3), Pages 112-121
2. Samadi M., Shedden, B.A., Smith, D.I., Collins, G.A. Hutchings, R, Tendays, J. (1993). *Surf. Coat. Technol.* 59, 261
3. Selçuk, R. Ipek and M. B. Karam. 2003. A study on friction and wear behaviour of carburized, carbonitrided and borided AISI 1020 and 5115 steels, *Journal of Materials Processing Technology*, **141** (2), 189-196
4. Abd El-Rahman, M., El-Hossary, F. M., Fitz, T., Negm, N. Z., Prokert, F., Pham, M. T., Richter, E. and Möller, W. (2004). Effect of N₂ to C₂H₂ ratio on r.f. plasma surface treatment of austenitic stainless steel, *Surface and Coatings Technology*, **183** (2-3), 268-274

Sintesis Kompleks Nikel(II)-N,N,-Dimethyl-ethylendiamin (dmed)

Rosdiana¹, Djulia Onggo¹, Ismunandar¹, Bohari M. Yamin²

1) Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung,
Jl. Ganesha 10. Bandung 40132, Indonesia.

E-mail: rosdiana_ak23@yahoo.com, djulia@chem.itb.ac.id, ismu@chem.itb.ac.id

2) Pusat Pengajian Sains Kimia dan teknologi Makanan,
Fakulti Sains dan teknologi, University Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan

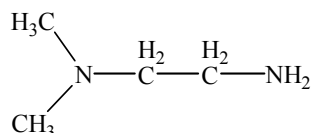
Abstrak

Senyawa kompleks nikel(II) dengan ligan N,N-dimetil-etilendiamin(dmed) telah disintesis dari garam nikel tiosianat. Kompleks yang berhasil diisolasi merupakan kompleks berinti tunggal dengan rumus kimia $[Ni(dmed)_2(NCS)_2]$. Senyawa kompleks ini berupa padatan kristalin berwarna biru, dengan ligan tiosianat berkonfigurasi cis (pengukuran difraksi sinar-X kristal tunggal). Spektrum VIS-NIR menunjukkan puncak serapan pada 10142 cm^{-1} yang berarti kekuatan medan ligan dmed sedikit lebih lemah dari ligan en, ini disebabkan karena adanya dua gugus metil pada ligan dmed. Hasil pengukuran kerentanan magnet kompleks $[Ni(dmed)_2(NCS)_2]$ menunjukkan kompleks bersifat paramagnetik normal untuk Ni(II) dengan momen magnet 3,23 BM.

Kata kunci: nikel(II), dmed, kristal tunggal.

1. Pendahuluan

Ligan N,N'-dimetil etilendiamin (dmed) merupakan ligan bidentat turunan dari etilendiamin dengan dua gugus metil pada salah satu atom donor Nitrogen. Adanya gugus metil ini dapat menurunkan interaksi atom donor dengan ion logam, sehingga dapat dibedakan panjang ikatan antara ion logam dengan dua atom donor nitrogen. Struktur ligan dmed ini diberikan pada Gambar 1 berikut:



Gambar 1 Struktur ligan dmed

Kompleks logam ini dengan ion logam transisi lain telah banyak diteliti, diantaranya kompleks heteronuklir dengan rumus molekul $[(dmed)CuCo(CO)_4]$ telah dilaporkan oleh Achternbosch dkk (Achternbosch, et al., 2004).

Pada makalah ini dibahas sintesis kompleks nikel(II) dengan dmed dari garam Ni(II)-tiosianat.

2. Percobaan

Senyawa kompleks ini disintesis dalam dua tahap reaksi, pertama reaksi larutan 1,46 g nikel(II)nitrat heksahidrat $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ dalam 3 mL metanol dengan larutan 0,81 g natrium tiosianat NaNCS dalam 2 mL methanol. Hasil reaksi adalah kompleks nikel(II) tiosianat berbentuk larutan yang segera direaksikan dengan 1,09 mL dmed dalam 2 mL metanol dengan bantuan pengadukan. Padatan kompleks terbentuk setelah reaksi berlangsung selama 15-20 menit. Padatan ini dipisahkan dari larutannya dengan cara disaring, dicuci dengan sedikit metanol dan dikeringkan dalam desikator vakum dengan pengering P_4O_{10} . Kristal tunggal diperoleh dari larutan kompleks dalam metanol setelah satu minggu.

Keberadaan ion tiosianat dideteksi dengan data

infra merah. Sampel kompleks dibuat pelet KBr, kemudian dilakukan pengukuran dengan alat *Perkin Elmer Spectrum One FTIR*. Spektrum elektronik diperoleh dari pengukuran serapan larutan kompleks dalam DMSO pada konsentrasi 10^{-2} M dengan Spektrofotometer UV-VIS NIR type DU 7500, *Beckman*. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 350 – 1350 nm, kecepatan lambat, interval 2,0 nm dan lebar slit 12,0 nm. Analisis struktur kompleks dilakukan dengan menggunakan metoda difraksi sinar-X kristal tunggal di Universitas Kebangsaan Malaysia.

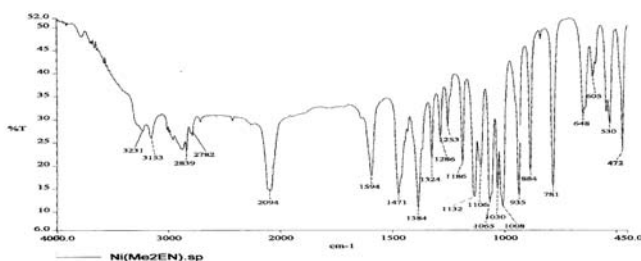
3. Hasil Pembahasan

Senyawa kompleks yang dihasilkan memiliki rumus kimia $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ini dibuktikan dari kadar ion logam yang diperoleh sebesar 15,16% (perhitungan 15,01%). Momen magnet senyawa ini diperoleh 3,23 BM sesuai dengan keberadaan dua elektron tak berpasangan pada senyawa kompleks nikel(II). Keberadaan gugus NCS^- diperoleh dari spektrum infra merah pada daerah 2094 cm^{-1} . Spektrum infra merah senyawa ini ditunjukkan

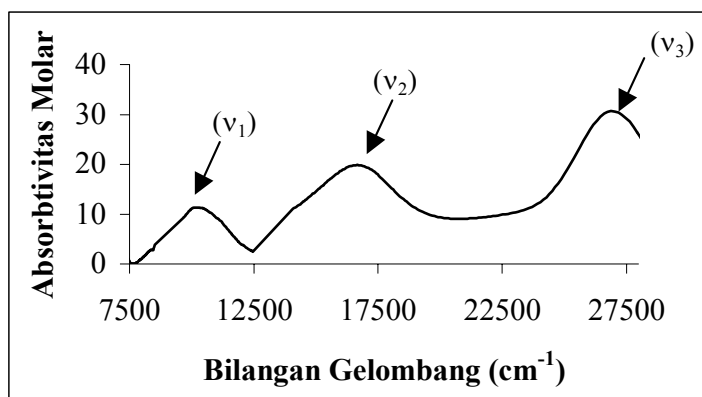
pada Gambar 2.

Kekuatan ligan campuran pada kompleks ini ditentukan dari data spektrum elektronik larutan kompleks dalam pelarut DMSO. Pada spektrum tersebut diamati adanya tiga puncak karakteristik untuk stereokimia oktahedral untuk nikel(II). Puncak serapan pertama (v_1) pada 10142 cm^{-1} sesuai dengan transisi ${}^3\text{T}_{2g} \leftarrow {}^3\text{A}_{2g}$, puncak kedua (v_2) sebagai transisi ${}^3\text{T}_{1g}(\text{F}) \leftarrow {}^3\text{A}_{2g}$ terdapat pada 16667 cm^{-1} dan puncak ketiga (v_3) pada 26882 cm^{-1} yang sesuai dengan transisi ${}^3\text{T}_{1g}(\text{P}) \leftarrow {}^3\text{A}_{2g}$. Perbandingan puncak pertama dan kedua diperoleh sebesar 1,64 yang menunjukkan struktur oktahedral normal. Dari data tersebut kekuatan ligan berada pada daerah yang sesuai untuk pembentukan senyawa spin transisi pada kompleks besi(II). Spektrum elektronik senyawa ini ditunjukkan pada Gambar 3.

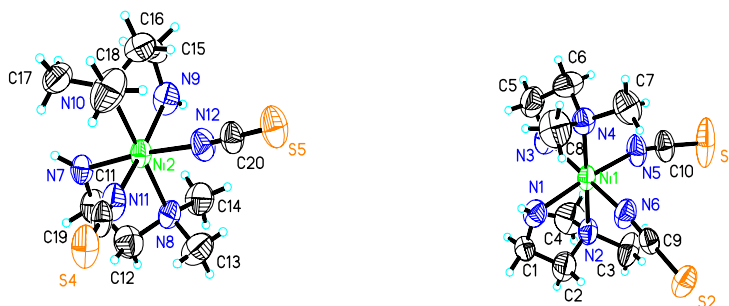
Struktur kompleks telah ditentukan dari difraksi sinar-X kristal tunggal. Kristal ini berwarna biru terang, kristal bertipe monoklinik dengan dimensi sel satuan $a = 13,341(13) \text{ \AA}$, $b =$



Gambar 2 Spektrum IR kompleks $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



Gambar 3 Spektrum elektronik larutan kompleks $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{SCN})_2]$



Gambar 4 Struktur molekul kristal tunggal senyawa kompleks $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{SCN})_2]$ yang diperoleh dari data difraksi

Tabel 1 Jarak Ikatan untuk $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2]$

Atom	Jarak Ikatan (Å)
Ni (1) – N (1)	2,099 (10)
Ni (1) – N (2)	2,203 (10)
Ni (1) – N (3)	2,120 (10)
Ni (1) – N (4)	2,199 (10)
Ni (1) – N (5)	2,067 (10)
Ni (1) – N (6)	2,066 (10)
Ni (2) – N (7)	2,101 (10)
Ni (2) – N (8)	2,215 (10)
Ni (2) – N (9)	2,123 (9)
Ni (2) – N (10)	2,183 (9)
Ni (2) – N (11)	2,045 (9)
Ni (2) – N (12)	2,066 (10)

Tabel 2 Sudut Ikatan untuk $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2]$.

Atom	Sudut Ikatan (°)
N (11) – Ni(2) – N (12)	89,3 (4)
N (11) – Ni(2) – N (7)	87,6 (4)
N (12) – Ni(2) – N (7)	171,9 (5)
N (11) – Ni(2) – N (9)	173,8 (4)
N (12) – Ni(2) – N (9)	89,6 (4)
N (7) – Ni(2) – N (9)	94,2 (4)
N (11) – Ni(2) – N (10)	92,3 (4)
N (12) – Ni(2) – N (10)	90,4 (4)
N (7) – Ni(2) – N (10)	97,2 (4)
N (9) – Ni(2) – N (10)	81,6 (4)
N (12) – Ni(2) – N (8)	90,2 (4)
N (7) – Ni(2) – N (8)	81,5 (4)
N (9) – Ni(2) – N (8)	95,9 (4)
N (10) – Ni(2) – N (8)	177,1 (4)

16,262(16) Å, $c = 16,899(16)$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 112,004^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ dan grup ruang $P2_1/C$. Dari data tersebut diamati posisi ligan monodentat maupun bidentat pada struktur kompleks dengan konfigurasi *cis*. Ini berlainan dengan yang diamati oleh Squattrito dkk (Squattrito, et al., 1996) pada kompleks analog $[\text{Ni}(\text{en})_2(\text{SCN})_2] \cdot \text{C}_6\text{H}_6$. Adanya gugus benzen

menyebabkan struktur kompleks tersebut memiliki konfigurasi *trans*. Gambar 4 menunjukkan struktur kompleks nikel(II) selengkapnya.

Panjang ikatan Ni-N(NCS) rata-rata adalah 2,061 Å. Ini lebih pendek dari panjang ikatan rata-rata Ni-N(dmed) yang diamati sebesar 2,200 Å untuk atom N yang mengandung dua

Tabel 3 Posisi-posisi Atom ($\times 10^4$)

	x	y	z
Ni(1)	4668(1)	8488(1)	2538(1)
Ni(2)	9388(1)	452(1)	2416(1)
S(1)	5573(3)	804(2)	1237(3)
S(2)	8413(4)	-2156(2)	3176(4)
S(3)	1959(3)	8273(2)	3760(3)
S(4)	2570(3)	10944(2)	1663(3)
N(1)	9559(8)	1449(6)	1689(7)
N(2)	8933(8)	-192(6)	1184(6)
N(3)	11065(8)	192(7)	2834(7)
N(4)	9887(8)	1098(6)	3648(6)
N(5)	7799(8)	813(6)	2102(8)
N(6)	9171(9)	-624(6)	2983(8)
N(7)	5599(8)	7535(6)	3304(7)
N(8)	5544(8)	9214(6)	3702(6)
N(9)	5772(7)	8725(6)	1930(6)
N(10)	3883(8)	7761(5)	1385(6)
N(11)	3497(8)	8205(7)	3002(7)
N(12)	3785(8)	9510(6)	1945(8)
C(1)	9472(11)	1134(9)	834(8)
C(2)	8654(13)	462(10)	544(10)
C(3)	9838(13)	-730(10)	1151(11)
C(4)	7980(12)	-736(11)	938(11)
C(5)	11649(11)	682(10)	3605(10)
C(6)	10977(12)	738(10)	4153(9)
C(7)	9180(13)	897(10)	4110(10)
C(8)	9941(14)	1985(9)	3554(11)
C(9)	6893(10)	823(7)	1750(8)
C(10)	8886(10)	-1237(8)	3072(9)
C(11)	6288(11)	7848(10)	4168(9)
C(12)	5798(12)	8609(10)	4379(9)
C(13)	6507(11)	9631(9)	3685(9)
C(14)	4858(13)	9827(10)	3882(11)
C(15)	5494(11)	8257(9)	1171(9)
C(16)	4241(12)	8164(10)	751(9)
C(17)	2684(12)	7874(11)	1040(11)
C(18)	4083(14)	6895(8)	1531(10)
C(19)	3307(9)	10103(7)	1832(9)
C(20)	2847(10)	8228(7)	3316(9)

gugus metil dan 2,110 Å untuk atom N yang tidak mengandung gugus metil. Dari data tersebut ikatan Ni-N(NCS) lebih kuat karena ligan ini berupa anion walaupun NCS⁻ merupakan ligan monodentat. Pengamatan data panjang ikatan Ni-N yang mengandung gugus metil nampak lebih panjang dibanding dengan Ni-N yang tidak mengandung gugus metil. Data ini menunjukkan pengaruh gugus metil yang ruah mampu memperlemah koordinasi ion nikel dengan ligan. Data panjang ikatan kompleks ini terangkum pada Tabel 1.

Struktur yang diperoleh menunjukkan senyawa monomerik mirip dengan yang ditemukan oleh Freire dkk (Freire, et al., 2001) pada kompleks nikel(II) 2,9-dimethyl phenantrolin (dmph), dimana panjang ikatan rata-rata Ni-N(NCS) = 2,0165 Å dan Ni-N(dmph) = 2,1684 Å. Pada kompleks ini data panjang ikatan Ni-N lebih pendek dari yang diamati pada senyawa kompleks nikel(II) dengan ligan dmed, karena ligan dmph lebih kuat dari dmed yang disebabkan pengaruh cincin aromatik yang terdapat pada ligan dmph. Data sudut ikatan

dan posisi atom-atom pada kompleks ini dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

4. Kesimpulan

Senyawa kompleks $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ telah berhasil disintesis dari reaksi garam nikel(II) tiosianat dengan ligan dmed dalam pelarut metanol. Rumus kimia yang diperoleh ditentukan dari kadar ion nikel(II) sebesar 15,16% (teoritis 15,01%). Keberadaan gugus tiosianat diamati dari spektrum infra merah pada daerah 2094 cm^{-1} . Adanya dua elektron tidak berpasangan pada nikel(II) dibuktikan dari pengukuran kerentanan magnet yang dengan perhitungan diperoleh nilai momen magnet sebesar 3,23 BM dan struktur kompleks diperoleh dari difraksi sinar-x pada kristal tunggal. Dari data yang diperoleh ternyata struktur kompleks $[\text{Ni}(\text{dmed})_2(\text{NCS})_2]$ berupa oktahedral dengan konfigurasi *cis* terhadap ion nikel(II).

5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung atas dukungan pada penelitian ini dan University Kebangsaan Malaysia atas bantuan dalam penentuan difraksi sinar-X kristal tunggal.

6. Daftar Pustaka

Achternbosch, M. Apfel, J. Fuchs, R. Klüfers, P., Selle, A. (2004). Heteronukleare Komplexverbindungen mit Metall - Metall-Bindungen. IX [1]. Amin-kupfer(I)-carbonylmetallate mit Cobalt, Eisen oder Mangan. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*. **622**, 8, 1365 – 1373.

Freire, F., Baggio, S., Suescun, L., and Baggio, R., (2001), Comparative X-ray study of three nickel(II)-thiocyanate compounds, *Acta Cryst*, **C57**, 905-908.

Squatrito, P. J., Iwamoto, T., Nishikiori, S. (1996). Synthesis and crystal structure of bis(ethylene diamine)-isothiocyanatonickel(II)-benzene: a new 'Werner-type' clathrate compound., *Chem. Commun.* 2665-2666.

Dua Senyawa Oligostilbenoid Dari Kulit Batang *Shorea Mecistopteryx* Rild (Dipterocarpaceae)

Rusdiyah Fatatik^a, Yana M. Syah^a, Sjamsul A. Achmad^a, Euis H. Hakim^a, Lukman Makmur^a, Lia D. Juliawati^a, Laily B. Din^b, Jalifah Latip^b, Ikram M. Said^b

^a Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

^b School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kabangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E. Malaysia

Abstrak

Satu trimerstilben, ampelopsin E (1), dan satu tetramerstilben, vatikanol B (2), telah diisolasi untuk pertama kali dari ekstrak aseton kulit batang *Shorea mecistopteryx* Rild. Struktur kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi meliputi data spektroskopi UV, IR dan ¹H-NMR serta dibandingkan dengan data sejenis dari senyawa yang sama yang telah dilaporkan.

Kata kunci : Ampelopsin E, vatikanol B, *Shorea mecistopteryx* Rild., Dipterocarpaceae.

1. Pendahuluan

Dipterocarpaceae, atau yang lebih dikenal dengan nama meranti, keruing dan kamfer, merupakan tumbuhan pohon penghasil kayu yang sangat unggul. Penyebarannya meliputi Indonesia bagian barat, Malaysia, Brunei, dan Filipina hingga Iran Jaya dan Papua Nugini (Newman, 1999). Famili Dipterocarpaceae terdiri dari 16 genus dan 600 spesies. Dari 16 genus ini, 9 genus diantaranya dilaporkan terdapat di Indonesia, yaitu : *Anisoptera*, *Cotylelobium*, *Dipterocarpus*, *Shorea*, *Parashorea*, *Hopea*, *Dryobalanops*, *Vatica* dan *Upuna*. Genus utama dalam famili Dipterocarpaceae adalah *Shorea* (150 spesies), *Hopea* (100 spesies) dan *Dipterocarpus* (75 spesies). Sekitar 79 spesies genus *Shorea* telah dilaporkan terdapat di Indonesia, 56 spesies diantaranya tersebar di Kalimantan serta 27 spesies merupakan tumbuhan endemik Indonesia (Conquist, 1986).

Secara kimia Dipterocarpaceae adalah salah satu famili tumbuhan penghasil oligostilbenoid (Sotheeswaran, 1993). Senyawa oligostilbenoid yang dimaksud diatas meliputi dimer, trimer,

tetramer, heksamer, heptamer, oktamer stilbenoid. Laporan hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa beberapa senyawa oligostilbenoid yang berhasil diisolasi memperlihatkan aktivitas biologi seperti anti jamur (Pryce, 1977; Bokel, 1988), anti HIV (Dai, 1998), anti oksidan (Tanaka, 2000-b), anti bakteri (Sultanbawa, 1987; Geewananda, 1986), anti hepatotoksik (Oshima, 1993) dan anti inflamasi (Kitanaka, 1990).

Makalah ini akan melaporkan isolasi dan penentuan struktur dua senyawa oligostilbenoid, yaitu Ampelopsin E (1) dan Vatikanol B (2), dari ekstrak aseton kulit batang *Shorea mecistopteryx* Rild. Struktur kedua senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi, yang meliputi spektrum UV, IR dan ¹H-NMR serta dengan membandingkan data spektroskopi tersebut dengan data yang telah dilaporkan untuk senyawa sejenis.

2. Percobaan

Umum. Pada percobaan ini, titik leleh ditentukan dengan menggunakan alat Fisher-John. Spektrum UV ditentukan dengan spektrofotometer Varian Conc. 100, sedangkan

spektrum IR diukur dengan spektrofotometer FTIR Perkin Elmer Spectrum One. Spektrum NMR ditentukan dengan JEOL JNM A500 yang beroperasi pada 400 MHz (^1H) dan 100 MHz (^{13}C). Kromatografi Vakum Cair (KVC) dan Kromatografi Radial dilakukan dengan menggunakan silika gel Merck 60 GF₂₅₄, sedangkan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dikerjakan dengan plat aluminium berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ setebal 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan berkualitas teknis yang didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan kecuali CHCl_3 . Larutan 1,5% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ dalam 2N H_2SO_4 digunakan sebagai pereaksi penampak noda.

Bahan Tumbuhan. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah kulit batang *Shorea mecistopteryx* yang diperoleh dari kebun percobaan Darmaga, Bogor, Jawa Barat pada bulan Maret 2004. Contoh tumbuhan ini telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Bogor, Indonesia.

Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kulit batang *Shorea mecistopteryx* Rild. (3,0 kg) dimaserasi dengan aseton selama 24 jam, maserasi diulang sebanyak tiga kali. Ekstrak aseton (200 g) kemudian dicampur dengan eter untuk mengendapkan tannin. Filtrat diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering (92 g) yang relatif bebas tannin. Sebagian dari ekstrak kering tersebut (20 g) selanjutnya difraksinasi dengan KVC menggunakan silika gel G60 GF₂₅₄ dengan eluen yang ditingkatkan kepolarannya (*n*-heksana-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH) sehingga diperoleh 6 fraksi gabungan A (1.5 gr), B (8.8 gr), C (2.3 gr), D (0.9 gr), E (8.3 gr), dan F (6.2 gr). Fraksi E difraksinasi kembali menggunakan kromatografi radial (CHCl_3 -MeOH) dan KVC (*n*-heksana-EtOAc) menghasilkan 8 fraksi gabungan E1 - E8. Pemurnian fraksi E3 (3.4 gr) dengan berbagai teknik kromatografi meliputi kromatografi kolom cepat dan Kromatografi Radial dengan berbagai eluen menghasilkan senyawa **1** (51 mg) dan senyawa **2** (28 mg).

Senyawa **1** diperoleh berupa serbuk abu-abu, t.l. 197-199°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -13^\circ$ (c=0,1 dalam MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} 228 (bahu), 285 (bahu), 311 nm; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} 250 (bahu), 339 nm; IR (KBr) ν_{maks} 3343, 1605, 1513, 1448, 1238, 833 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (aseton-

d_6 , 400 MHz) δ_{H} senyawa **1** (ppm) lihat tabel 1.

Senyawa **2** diperoleh berupa serbuk coklat muda, t.l. 215-218°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -31^\circ$ (c=0,1 dalam MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} 203, 229 (bahu), 279 nm; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} 207, 249 (bahu), 288 nm; IR (KBr) ν_{maks} 3369, 1613, 1514, 1453, 1337, 1243, 1174, 1007, 831 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2** (aseton- d_6 , 400 MHz) δ_{H} (ppm) lihat tabel 2.

3. Pembahasan

Serbuk kulit batang *Shorea mecistopteryx* (3,0 kg) dimaserasi dengan aseton selama 24 jam. maserasi diulang sebanyak tiga kali. Ekstrak aseton (200 g) kemudian dicampur dengan eter untuk mengendapkan tannin dan diperoleh ekstrak kering (92 g) yang relatif bebas tannin. Sebagian dari ekstrak kering tersebut (20 g) selanjutnya difraksinasi dengan KVC sehingga diperoleh 6 fraksi gabungan A - F (1.5 g, 8.8 g, 2.3 g, 0.9 g, 8.3 g dan 6.2 g). Fraksinasi dan pemurnian terhadap fraksi E dengan berbagai teknik kromatografi menghasilkan senyawa **1** (51 mg) dan senyawa **2** (28 mg).

Senyawa **1** diperoleh berupa serbuk berwarna abu-abu, dengan titik leleh 197-199°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -31$ (c=0,1 dalam MeOH). Spektrum UV senyawa **1** dalam metanol menunjukkan adanya serapan maksimum yang khas untuk kromofor stilben pada λ_{maks} 228 (bahu), 285 (bahu), 311 nm dan mengalami pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser NaOH. Spektrum IR senyawa **1** memperlihatkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil (3343 cm^{-1}), C=C aromatik (1604, 1513, 1448 cm^{-1}), serta adanya benzena 1,4 disubstitusi (833 cm^{-1}). Berdasarkan data tersebut, dapat disarankan senyawa **1** sebagai suatu oligostilben yang memiliki kerangka stilben.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** memperlihatkan adanya proton-proton pada daerah alifatik dan aromatik. Adanya 3 gugus *p*-hidroksifenil ditunjukkan pada geseran kimia δ_{H} (ppm) 7,24 (2H, *d*, $J=8,6$ Hz) dan 6,85 (2H, *d*, $J=8,6$ Hz); 7,24 (2H, *d*, $J=8,6$ Hz) dan 6,85 (2H, *d*, $J=8,6$ Hz) serta 6,94 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz) dan 6,61 (2H, *d*, $J=8,8$ Hz). Empat sinyal proton aromatik dari 2 gugus 3,5-*m*-dihidroksifenil ditunjukkan pada geseran kimia δ_{H} 6,25 (4H, *d*, $J=2,2$ Hz) dan 6,19 (2H, *t*, $J=2,2$ Hz). Geseran kimia δ_{H} 6,46 (1H, *s*) merupakan sinyal proton aromatik

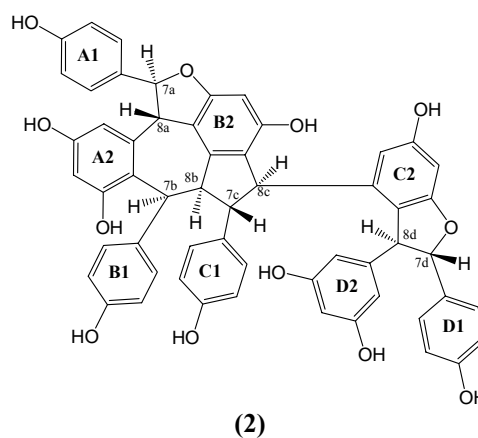
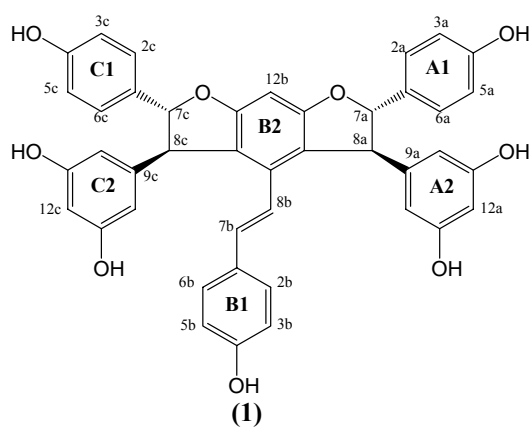
Tabel 1. Data spektrum ¹H-NMR senyawa 1 dan literatur (Oshima, 1993 dan Jayuska, A. 2001)

No.	δ_H (mult., J dalam Hz)			
	1	1*	1**	1***
2a,6a	7,24 (d, 8,6)	7,27 (d, 8,5)	7,26 (AA', 8,5)	7,23 (d, 8,6)
3a,5a	6,85 (d, 8,6)	6,87 (d, 8,5)	6,85 (XX', 8,5)	6,83 (d, 8,6)
7a	5,45 (d, 5,1)	5,47 (d, 5,0)	5,48 (d, 5,0)	5,43 (d, 5,1)
8a	4,56 (d, 5,1)	4,58 (d, 5,0)	4,56 (d, 5,0)	4,54 (d, 5,1)
10a,14a	6,25 (d, 2,2)	6,28 (d, 2,0)	6,26 (d, 2,0)	6,25 (d, 2,1)
12a	6,19 (t, 2,2)	6,21 (t, 2,0)	6,21 (t, 2,0)	6,18 (t, 2,1)
2b,6b	6,94 (d, 8,8)	6,96 (d, 8,5)	6,88 (AA', 8,8)	6,93 (d, 8,6)
3b,5b	6,61 (d, 8,8)	6,63 (d, 8,5)	6,62 (XX', 8,5)	6,60 (d, 8,6)
7b	6,66 (d, 16,7)	6,68 (d, 16,0)	6,56 (Br, s)	6,65 (d, 16,7)
8b	6,56 (d, 16,7)	6,58 (d, 16,0)	6,56 (Br, s)	6,55 (d, 16,7)
12b	6,46 (s)	6,49 (s)	6,47 (s)	6,46 (s)
2c,6c	7,24 (d, 8,6)	7,27 (d, 8,5)	7,26 (AA', 8,5)	7,23 (d, 8,6)
3c,5c	6,85 (d, 8,6)	6,87 (d, 8,5)	6,85 (XX', 8,5)	6,83 (d, 8,6)
7c	5,45 (d, 5,1)	5,47 (d, 5,0)	5,48 (d, 5,0)	5,43 (d, 5,1)
8c	4,56 (d, 5,1)	4,58 (d, 5,0)	4,56 (d, 5,0)	4,54 (d, 5,1)
10c,14c	6,25 (d, 2,2)	6,28 (d, 2,0)	6,26 (d, 2,0)	6,25 (d, 2,1)
12c	6,19 (t, 2,2)	6,21 (t, 2,0)	6,21 (t, 2,0)	6,18 (t, 2,1)

1* Ampelopsin E dari *Ampelopsis brevipedunculata* Van hancei

1** *cis*-Ampelopsin E dari *Ampelopsis brevipedunculata* Van hancei

1*** Ampelopsin E dari *Shorea pinanga*.



dari H-12b. Karakteristik sinyal proton dalam bentuk gugus diaril benzofuran juga ditunjukkan pada spektrum ¹H-NMR yaitu pada δ_H 5,45 (2H, *d*, *J*=5,1 Hz) dan 4,56 (2H, *d*, *J*=5,1 Hz). Adanya pasangan multiplisitas doublet pada δ_H 6,66 (1H, *d*, *J*=16,7 Hz) dan 6,56 (1H, *d*, *J*=16,7 Hz) mengindikasikan adanya vinil dengan konfigurasi *trans*. Unit-unit struktur yang diperoleh dari spektrum ¹H-NMR tersebut sesuai dengan ampelopsin E (1). Konfirmasi senyawa 1 sebagai ampelopsin E selanjutnya diperoleh dari perbandingan data ¹H-NMR dengan data yang sama yang telah dilaporkan (Tabel 1).

Ampelopsin E (1), berdasarkan penelusuran literatur yang telah dilakukan, adalah trimer resveratrol yang untuk pertama kalinya ditemukan dalam akar tumbuhan *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* (Vitaceae).

Senyawa 2 diperoleh berupa serbuk berwarna coklat muda, TL 215-218°C, $[\alpha]_D^{20}$ -31 (*c*=0,1 dalam MeOH). Spektrum UV senyawa 2 dalam metanol menunjukkan adanya serapan maksimum yang khas untuk kromofor fenol sederhana pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 204, 230 (bh) dan 284 nm) dan mengalami pergeseran batokromik pada penambahan pereaksi geser NaOH. Spektrum

Tabel 2. Data spektrum ¹H-NMR senyawa **2** dan literatur (Tanaka, 2000-c dan Atun 2004)

No.	δ_{H} (mult., J dalam Hz)		
	2	2*	2**
2a,6a	7,23 (d, 8,6)	7,23 (d, 8,8)	7,24 (d, 8,4)
3a,5a	6,78 (d, 8,6)	6,79 (d, 8,8)	6,78 (d, 8,4)
7a	5,76 (d, 10,8)	5,77 (d, 11,7)	5,77 (d, 14,7)
8a	4,44 (d, 10,8)	4,44 (d, 11,7)	4,44 (d, 14,7)
12a	6,27 (d, 2,2)	6,29 (d, 2,0)	6,27 (d, 2,6)
14a	6,11 (d, 2,2)	6,12 (d, 2,0)	6,11 (d, 2,6)
2b,6b	7,16 (d, 8,6)	7,17 (d, 8,8)	7,17 (d, 8,4)
3b,5b	6,69 (d, 8,6)	6,70 (d, 8,8)	6,70 (d, 8,4)
7b	5,20 (d, 3,6)	5,21 (d, 3,9)	5,21 (d, 4,3)
8b	3,09 (d, 10,0)	3,13 (dd, 3,9 ; 11,3)	3,13 (dd, 4,3 ; 10,0)
12b	6,03 (s)	6,05 (s)	6,03 (s)
2c,6c	6,40 (d, 8,4)	6,42 (d, 8,8)	6,42 (d, 8,4)
3c,5c	6,50 (d, 8,4)	6,52 (d, 8,8)	6,52 (d, 8,4)
7c	4,08 (t, 10,8)	4,10 (dd, 10,7; 11,3)	4,11 (t, 10,0; 10,0)
8c	4,55 (d, 10,8)	4,55 (d, 10,7)	4,55 (d, 10,5)
12c	6,18 (d, 2,2)	6,21 (d, 2,0)	6,19 (d, 2,7)
14c	6,46 (d, 2,2)	6,49 (d, 2,0)	6,47 (d, 2,7)
2d,6d	7,18 (d, 8,6)	7,19 (d, 8,8)	7,21 (d, 8,4)
3d,5d	6,76 (d, 8,6)	6,78 (d, 8,8)	6,76 (d, 8,4)
7d	5,37 (d, 5,1)	5,38 (d, 4,7)	5,37 (d, 6,5)
8d	4,67 (d, 5,1)	4,68 (d, 4,7)	4,67 (d, 6,5)
10d	6,09 (br, s)	6,10 (d, 2,4)	6,11 (d, 2,5)
12d	6,28 (t, 2,2)	6,30 (t, 2,4)	6,28 (t, 2,5)
14d	6,09 (br, s)	6,10 (d, 2,4)	6,11 (d, 2,5)

2* Vatikanol B dari *Vatica rassak*

2** Vatikanol B dari *Vatica pauciflora*

IR senyawa **2** yang memperlihatkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil (3369 cm⁻¹), C=C aromatik (1613, 1514, 1453 cm⁻¹), serta adanya benzena 1,4 disubstitusi (831 cm⁻¹). Berdasarkan data tersebut, dapat disarankan senyawa **2** sebagai suatu oligomer resveratrol.

Spektrum ¹H-NMR senyawa **2** memperlihatkan adanya empat kelompok proton aromatik yang berkopling *orto* dari empat gugus *p*-hidroksifenil pada geseran kimia δ_{H} (ppm) 7,23 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz), 6,78 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz): 7,18 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz), 6,76 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz): 7,16 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz), 6,69 (2H, *d*, *J*=8,6 Hz) dan 6,50 (2H, *d*, *J*=8,4 Hz), 6,40 (2H, *d*, *J*=8,4 Hz). Selanjutnya satu buah gugus 3,5-*m*-dihidroksifenil ditunjukkan pada geseran kimia δ_{H} 6,28 (1H, *t*, *J*=2,2 Hz), 6,09 (2H, *br, s*). Dua kelompok proton aromatik yang berkopling *meta* pada cincin benzena 1,2,3,5-tetra-substitusi ditunjukkan pada 6,27 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz), 6,11 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz) dan 6,46 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz), 6,18 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz). Suatu proton aromatik dari cincin benzena penta-substitusi ditunjukkan pada geseran kimia δ_{H}

(ppm) 6,03 (1H, *s*). Adanya sinyal alifatik dari dua cincin dihidrofuran ditunjukkan pada geseran kimia δ_{H} (ppm) 5,76 (1H, *d*, *J*=10,8 Hz) dan 4,44 (1H, *d*, *J*=10,8 Hz); 5,37 (1H, *d*, *J*=5,1 Hz) dan 4,67 (1H, *d*, *J*=5,1 Hz). Unit-unit struktur yang diperoleh dari spektrum ¹H-NMR tersebut sesuai dengan vatikanol B (**2**). Konfirmasi senyawa **2** sebagai vatikanol B selanjutnya diperoleh dari perbandingan data ¹H-NMR dengan data yang sama yang telah dilaporkan (Tabel 2). Dari data yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa senyawa vatikanol B merupakan senyawa yang jarang ditemukan dari tumbuhan genus *Shorea* (Aminah, 2003).

4. Kesimpulan

Dua senyawa oligomerresveratrol telah berhasil di isolasi untuk pertama kalinya dari kulit batang *Shorea mecistopteryx* Rild. Kedua senyawa tersebut adalah satu trimer resveratrol, ampelopsin E, dan tetramer resveratrol, vatikanol B.

5. Ucapan Terima kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada staf Herbarium Bogoriense, bogor yang telah mengidentifikasi bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

Aminah, N.S., 2003, "Fitokimia beberapa spesies *Shorea* (Dipterocarpaceae) Hutan Tropika Kalimantan", Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung, Indonesia, 126-127.

Atun, S., 2004, "Fitokimia beberapa spesies Dipterocarpaceae Indonesia dari genus *Vatica*, *Anisoptera hopea* dan *Dipterocarpus*", Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung, Indonesia.

Bokel, M.; Diyasena, M.N.C., Gunatilaka A.A.L.; Kraus, W.; Sotheeswaran, S. Calikulatol, an antifungal resveratrol trimer from *Stemonoporus canaliculatus*", *Phytochemistry*, 1988, 27, 377-380

Cronquist, A., 1981, *An integrated system of classification of flowering plant*, Columbia University Press, New York, 317-318

Dai, J.R.; Hallock, Y.F.; Cardellina, J.H.; Boyd, M.R. "HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*", *J. Nat. Prod.*, 1998, 61, 351-353

Geewananda, Y.A.; Gunawardena, P.; Sotheeswaran, S.; Sultanbawa, M.U.S.; Surendrakumar.S.; Bladon, P. Another antibacterial polyphenol, coppaliferol B, from *Vateria copallifera* (Dipterocarpaceae)", *Phytochemistry*, 1986, 25, 1498-1500

Jayuska, A, 2001, Senyawa baru hasil degradasi Ampelopsin E dan resveratrol oligomer lainnya dari kulit batang *Shorea pinanga* SCHEFF., Tesis Magister Kimia ITB.

Kitanaka, S.; Takido, M.; Mizoue, K.; Kondo, H.; Nakaïke, S. Oligomeric stilbenes from *Caragana Chamlagu* lamarck root", *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 44, 565-567

Newman, P.F.; Whitmore, T.C. 1999 *Pedoman Identifikasi Pohon-pohon Dipterocarpaceae Pulau Kalimantan*, Prosea Indonesia, Penerbitan Perdana, Bogor, 389-390

Oshima, Y.; Ueno, Y.; Hisamichi, K.; Takeshita, M. Ampelopsin F and G, novel bridged plant oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* roots", *Tetrahedron*, 1993, 5801-5804

Oshima, Y., Ueno, Y., Ampelopsins D, E, H and cis-Ampelopsin E, Oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* Var. *Hancei* Roots", *Phytochemistry*, 1993, 33, 179-182

Pryce, R.J., Langcake, P. "α-viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevine", *Phytochemistry*, 1977, 16, 1452-1454

Tanaka, T.; T. Ito, K. Nakaya, M.; Iinuma, Y.; Takashashi, H.; Naganawa, N.; Matsuura, M.; Ubukata. Vaticanol D a novel resveratrol hexamer isolated from *Vatica rassak*, *Tetrahedron letters*, 2000-b, 41, 7929-7932

Tanaka, T.; T. Ito, K. Nakaya, M.; Iinuma, M.; Riswan, S. Oligostilbenoids in steam bark of *Vatica rassak*, *Phytochemistry*, 2000-c, 54, 63-69

Tukiran, 2003, "Senyawa mikromolekul dari beberapa tumbuhan meranti (*Shorea*) Indonesia", Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung, Indonesia, 92-95

Sultanbawa, m.U.S.; Surendrakumar.S.; Bladon, P. "Disticol an antibacterial polyphenol from *Shorea distica*", *Phytochemistry*, 1987, 26, 799-801

Genetic Engineering of Oil Palm for the Production of Biodegradable Plastics

Ruslan Abdullah, Rashdan MM, Siti Azma J, Joseph JL & Yeun LH

School of Bioscience & Biotechnology, Faculty of Science & Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM-Bangi, Malaysia
(Email: russzn@ukm.my)

Abstract

The idea to genetically engineer oil palm for biodegradable plastics production was based on its fairly established *in vitro* protocol and their susceptibility to foreign gene transfer, either using biolistic or *Agrobacterium* that are not limited to specific target tissues or varieties. Instead, different target tissues of *Elaeis guineensis* (var. *dura*, *pisifera*, *tenera*) and *E. oleifera* were susceptible to foreign gene uptake. Oil palm has abundant acetyl-CoA, the common precursor for both fatty acids and biodegradable plastics. Here, oil palm was genetically engineered to produce two biopolymers, polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) and polyhydroxybutyrate (PHB). Engineering of *bktB*, *phaB* and *phaC* genes will convert acetyl-CoA to PHB. For PHBV production, an additional gene, *tdcB*, is needed to produce propionyl-CoA. Cassettes containing the genes driven by CaMV35S, modified CaMV35S, actin and ubiquitin promoters were constructed, each flanked by a promoter, plastid targeting sequence and polyA signal. The expression cassettes were cloned into pCAMBIA1301 and pCAMBIA1305.2 yielding pMR606, pMR706, pJLPHB3 and pSAPHA1305.2. pMR606 and pMR706 contains all 4 genes driven by CaMV35S promoter were designed for PHBV production. Comparatively, pJLPHB3 and pSAPHA1305.2 have *bktB*, *phaB* and *phaC* driven by modified CaMV35S and ubiquitin promoter, respectively, were designed for PHB. Except for pSAPHA1305.2 (transformed into *A. rhizogenes* A4), all other expression vectors were transformed into *A. tumefaciens* LBA4404. Various target tissues were co-cultivated with *Agrobacterium* carrying individual expression vectors and successful gene transfer was observed from gus assay on putative transformed target tissues, callus and plantlets derived from them. Stable GUS expressions were detected in leaf and root tissues of 9-month old putative transformants. Integration of the *bktB*, *phaB*, *phaC* and *tdcB* genes were evident from PCR, RT-PCR, multiplex PCR and Real Time PCR analyses and the transgenes integrity were further confirmed using PCR-Southern analysis and nucleotide sequencing analyses. The presence of additional granules, possibly PHB, was observed in tissues analysed using TEM.

Keywords: Oil palm, genetic engineering, *Agrobacterium*-mediated gene transfer, biodegradable plastics,

1. Introduction

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and *E. oleifera* have been shown susceptible to foreign gene uptake. Genetic engineering of oil palm could be done either using direct uptake (biolistic) or using vector-mediated gene transfer (*Agrobacterium* sp) approach (Alizah & Abdullah, 1996, Rashdan & Abdullah 1999). Following successes in genetic engineering of oil palm, transgenic plants with genes conferring resistance to insect were shown toxic to bagworm larvae (Abdullah et al, 2003).

It was also shown that the 8-year old transgenic plants carrying the stably integrated CpTI gene also produced embryo-rescued T₁ plants with CpTI genes in them. These studies showed that oil palm is not only amenable to genetic engineering but also able to transmit the transgenes into subsequent generation.

The main product of oil palm is oil extracted from mesocarp and palm kernel. As such, oil palm has abundant supply of acetyl-CoA, the main precursor in fatty acid synthesis.

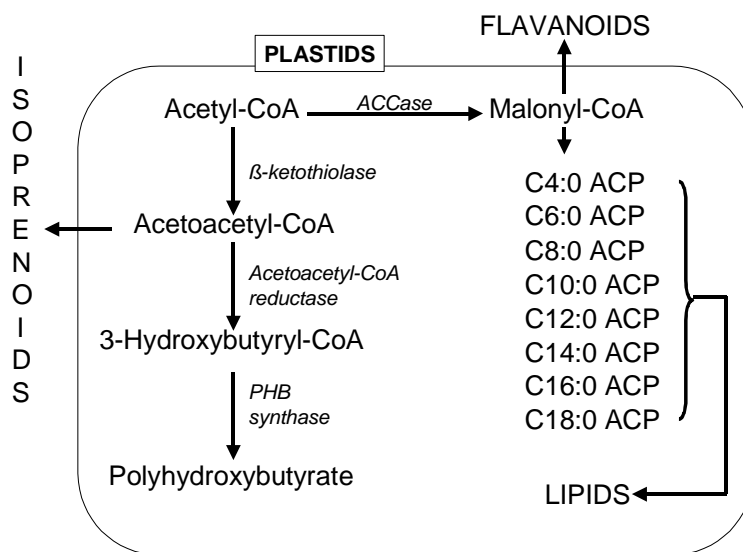


Figure 1. Pathway for the biosynthesis of fatty acid and polyhydroxybutyrate (PHB) showing the central role of acetyl-CoA

Coincidentally, acetyl-coA is also the main precursor for polyhydroxybutyrate (PHB). PHB is the main building block for biodegradable polymers (Figure 1), which commands high commercial value.

However, unlike biosynthesis of fatty acids, the production of PHB in oil palm would require the introduction of several novel genes. These include β -ketothiolase (bktb or phaA), acetoacetyl-CoA reductase (phaB), polyhydroxybutyrate synthase (phaC) and threonine decarboxylase B (tdcB). Except for bktb (phaA), all other genes are not naturally present in oil palm and therefore have to be introduced. However, through gene manipulation, it is possible to genetically engineer all these foreign genes into oil palm for the production of biodegradable plastics.

Ralstonia eutropha, through the activity of phaA, phaB and phaC is able to produce PHB, naturally. Thus, this study evaluates the possibility of engineering oil palm with phaA, phaB and phaC and tdcB genes for the production of bioplastics (Abdullah 2004).

2. Experimental

Plant Materials

Several tissue types from various variety and species of oil palm were used as target to receive the foreign genes. They include immature embryo, primary and secondary calli derived from various explants such as leaf,

roots and inflorescences. Preparation of the respective target tissues have been described elsewhere (Alizah & Abdullah, 1996, Abdullah et al, 1997, 2005).

Gene and plasmids

The respective phaA, phaB and phaC and tdcB genes were cloned into binary and superbinary vectors complete with their own promoter and plastid targeting sequence. Vectors used in this study are shown in Figure 2. Cloning was carried out using standard molecular biology techniques described by Sambrook et al, (1989) with modifications where necessary.

Gene transfer system

Foreign gene transfer into oil palm target tissues were carried out using both biolistic (Alizah and Abdullah, 1996) and *Agrobacterium*-mediated (Rashdan & Abdullah, 1999). Plants were regenerated from putative transformed target tissues and were subjected to several molecular analyses such as PCR, PCR-Southern, multiplex-PCR, RT-PCR, sequencing and analysis through transmission electromicroscopy.

3. Results and Discussion

Gene transfer into oil palm

We have demonstrated that, with the appropriate pre-treatment, oil palm tissues irrespective of their species and varieties, are susceptible to foreign gene transfer using both biolistic and *Agrobacterium*-mediated gene

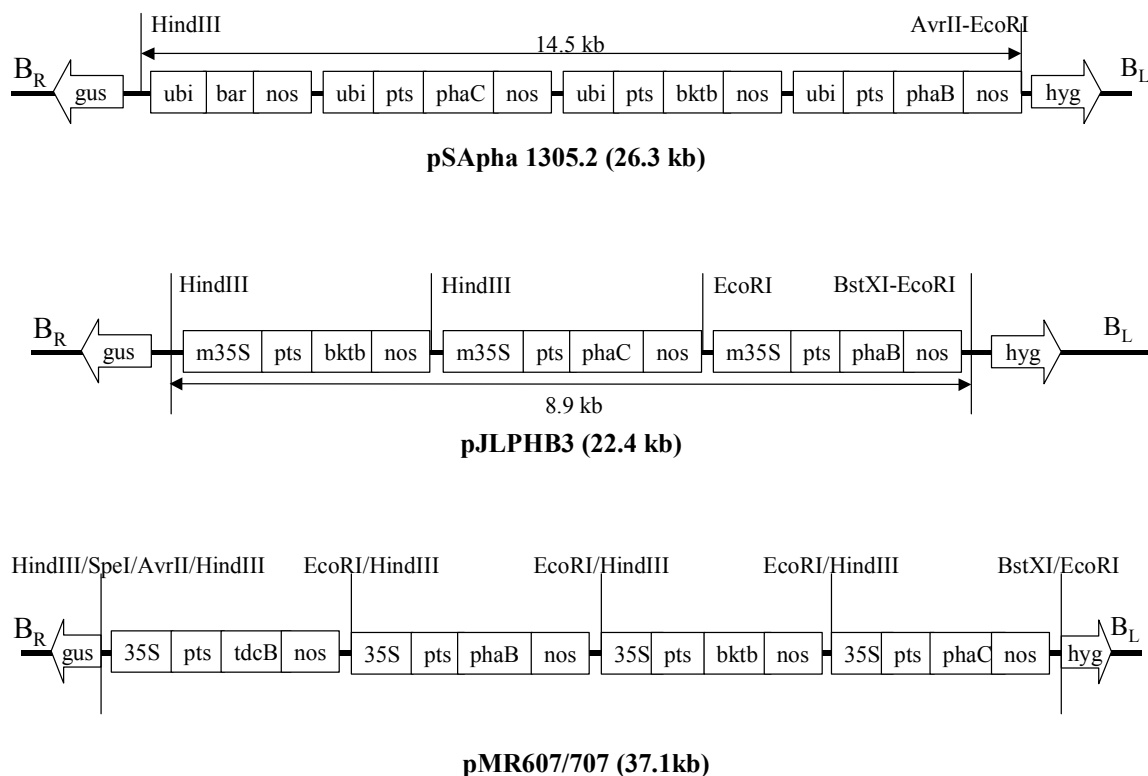


Figure 2. Binary and superbinary vector constructs used to deliver phaA, phaB, phaC and tdcB genes into oil palm target tissues. pSapha1305.2 consists of phaA, phaB and phaC genes each driven by ubiquitin promoter and a targeting sequence cloned into pCAMBIA1305.2. pJLPHB3 consists of phaA, phaB and phaC genes each driven by modified 35S promoter and a targeting sequence cloned into pCAMBIA1304. pMR607 and pMR 707 are superbinary vectors consisting phaA, phaB phaC and tdcB genes each driven by CaMV35 promoter and a targeting sequence cloned into pCAMBIA1305.2

transfer. Here and in our earlier studies, we shows that target tissues from *Elaeis guineensis* Jacq. variety tenera, dura and pisifera, and *Elaeis oleifera* were successfully transformed with binary and superbinary plasmids carrying the respective PHB genes. Figure 3 shows the pathway involved in a typical *Agrobacterium*-mediated gene transfer for oil palm using immature embryos as the target tissues. Similar sequence was also followed when using other target tissues such as primary and secondary calli.

Successful gene transfer

In this study, genes successfully transferred into the target tissues are phaA, phaB phaC and tdcB, that are necessary for the production PHB in oil palm. Evidence for successful gene transfer was first demonstrated from gus assay carried out on putative transformants (Figure 4). The presence of blue deposits in putative

transformants was only possible if the gus gene is expressed by plant gene expression system. This is due to the presence of intron within the gus gene that could not be spliced out during gene expression by bacterial system. Thus, the ability of the gus gene to be transcribed, intron spliced out and later translated into protein (enzymes) that in turn act upon 5-bromo-4-chloro-3-indoyl glucuronide (x-gluc) indicates that the gus gene has been successfully transferred into plant cells and was able to be act upon by plant gene expression system. This resulted in the conversion of x-gluc into 5,5'-dibromo 4,4'-dichloro indigo (highly insoluble and highly coloured indigo dye) at the site of gus enzyme activity. However, as indicated by our earlier work, positive gus expression may not necessarily indicate stable integration of transgenes into target tissues. Thus further

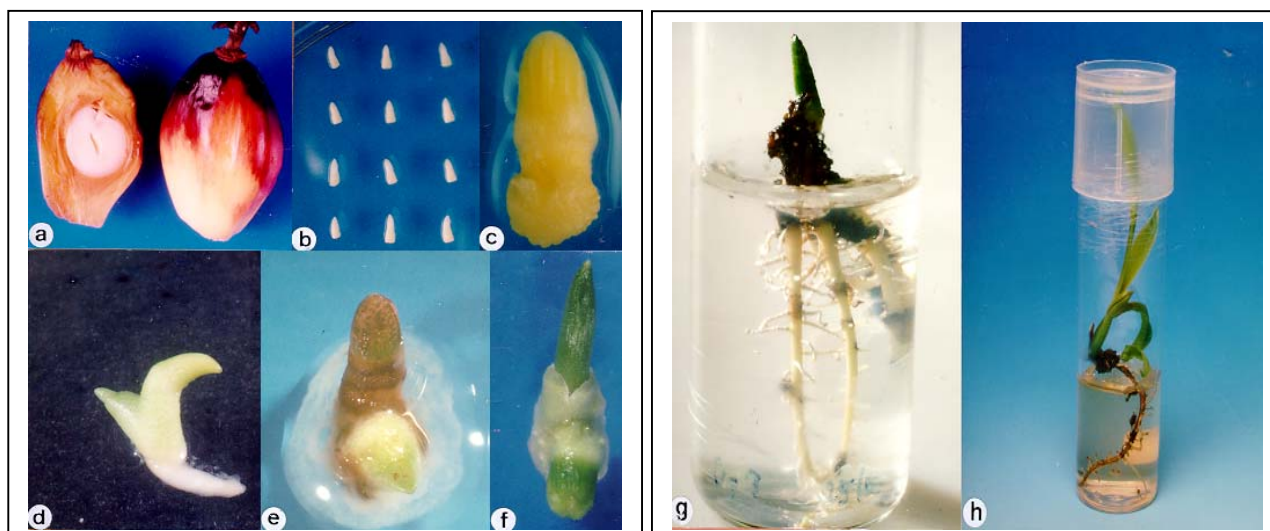


Figure 3. Agrobacterium-mediated gene transfer of oil palm immature embryo showing (a) immature fruits as source of one of the target tissues, immature embryo (b) undergoing pre-treatment (c) followed by co-cultivation in Agrobacterium carrying the respective plasmids (e) and subsequent plant regeneration (d, f, g and h).



Figure 4. Gus assay on putative transformants showing blue deposits at sites of gus gene activity (a) on bombarded immature embryos, (b) on co-cultivated immature embryos, (c) along vascular bundles of co-cultivated immature embryos, (d) on the co-cultivated immature embryos and (e) in shoots and leaf tissues of a plantlet regenerated from target tissues

evaluation was carried out on the putative transformants.

Molecular evidence for successful gene transfer

Putative transformants (freshly bombarded or co-cultivated target tissues, target tissues-derived callus, plantlets and their respective parts) were analysed using common molecular

techniques to ascertain successful gene transfer. PCR analyses were carried out on gus positive samples using primers corresponding to the respective genes. Analyses carried out either for single amplification or through multiplex PCR shows that all phaA, phaB, phaC and tdcB were present in putative transformants derived from target tissues transformed with the

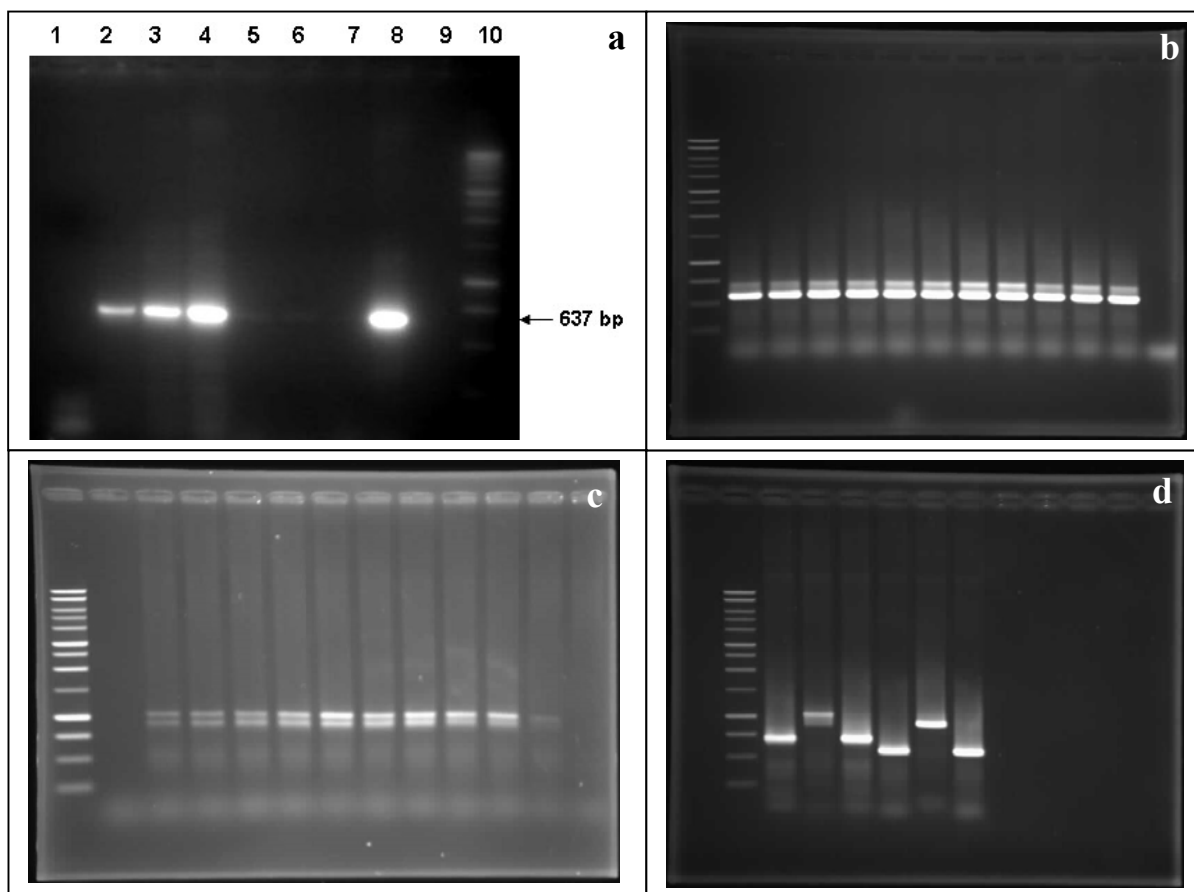


Figure 5. PCR analyses of genomic DNA from putative transformants derived from co-cultivated immature embryos showing the presence of (a) phaB amplified individually, (b) phaA and phaB, (c) phaC and tdcB genes and (b) phaA, phaB and phaC genes amplified simultaneously

respective genes. This was evident from successful amplification of the expected bands using primers for the respective gene(s) of interest (Figure 5). In the case of phaA (bktb) harboured in pSapha1305.2, the expected 0.8kb fragment was successfully amplified using primers specific to the phaA (bktb) gene. Similarly, the expected 637bp was amplified for phaB genes from genomic DNA of putative transformants analysed (Siti Azma & Abdullah, 2004). Unlike pJLPHB3 and pMR607 or pMR707, pSapha1305.2 uses *Agrobacterium rhizogenes* as the vector for transformation into oil palm. These observations further confirmed that oil palm tissues, given the right pre-treatment are susceptible to both *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*.

Evidence for successful transfer and integration of transgenes for PHB production in putative transgenic oil palm was further confirmed from nucleotide sequence analyses carried out on the respective PCR products produced with 100% homology to the original transgenes

transferred. The functionality of PHB synthesizing genes was further tested using other techniques including multiplex PCR and RT-PCR (Rashdan et al 2004). Results obtained showed that, the genes are transcribed indicating that the genes are fully functional in its new environment.

Electron Microscopy

Given that the PHB synthesizing genes were successfully transferred, integrated and functional, the next stage would be to evaluate the end products following expression of transgenes in its new environment. Evaluation of leaf tissues from putative transgenic plants shows the presence of additional granules very similar to those of PHB (Figure 6). These granules, however, were absent in leaf tissues of control non-transformed plants. This suggests that the presence of PHB synthesizing genes in the putative transformed plants may have resulted in the possible production of the desired end product (Joseph & Abdullah, 2004). The PHB synthesizing genes may be

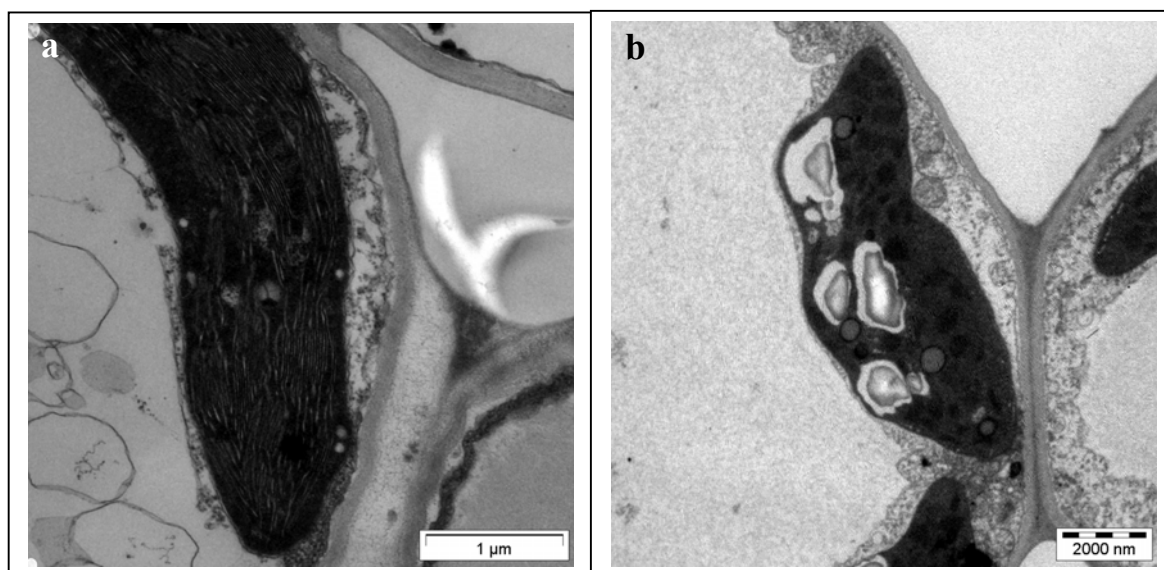


Figure 6. Analyses of leaf tissues from (a) non-transformed control and (b) putative transformed plants using transmission electron microscopy. Additional granules were observed in the chloroplast of leaf tissues of putative transformed plants. No similar granules were observed in chloroplast of non-transformed control plants.

involved in shunting the pathway from lipid synthesis to PHB production, as shown with the presence of the granules. Nevertheless, the number of granules observed was low suggesting poor efficiency of the system. This may be due to competition between enzymes involved in lipid biosynthesis and those for PHB production, for the common substrate, acetyl CoA. It is therefore suggested that the activity of *bktb* must be up-regulated to ensure the acetyl CoA flux towards PHB production is higher than those for lipid biosynthesis. Only then the production of PHB can be improved. However, the true identity and its property needs further studies. Therefore the next stage would be to improve the efficiency of the system followed by the extraction of putative PHB granules for identification analyses.

4. Conclusion

Our study further confirmed that oil palm is amenable to genetic engineering using both direct and vector mediated gene transfer system. The systems developed to genetically engineer oil palm are independent of species, varieties and types of target tissues used. In addition both *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* could be used as vectors to transfer foreign genes into oil palm such as those for the production of biodegradable plastics. A multi-gene system is required for metabolic engineering of oil palm for biodegradable plastic production. These were achieved

through the construction of various multi-gene constructs harbouring the necessary genes required for biosynthesis of PHB. Successful transfer and integration of PHB synthesizing genes was evident from *gus* assay, PCR, multiplex PCR, nucleotide sequence analyses carried out on tissues from putative transformants. And most importantly, observation using transmission electron microscopy further indicates the production of additional granules in leaf tissues of putative transformants. These granules were, however, absent in control, non-transformed plants. Even though the true nature of the postulated PHB observed in the putative transgenic oil palms needs further verification, but, results obtained showed that oil palm can be metabolically engineered for the production of value added products.

5. Acknowledgement

The project was supported by the Ministry of Science, Technology and Innovation, under the Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme.

6. References

Abdullah, R, Alizah, Z, Wee YH, Rashdan MM, Yeun LH, Siti Zubaidah, S & Leaw CL (1997). Development of genetic transformation methods for oil palm improvement. *The Plant Molecular Biology Reporter* 15(3).

Abdullah R, Chari C, Yap WSP & Yeun LH (2003). *Transgenic oil palm with stably integrated CpTI*

gene confers resistance to bagworm larvae. In: IK Vasil (ed) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond: A celebration and a showcase*. Kluwer Academic Publishers. pp163-165.

Abdullah R (2004). Current status of metabolic engineering of oil palm for bioplastic production. Paper presented at the 3rd MMBPP Workshop, 26-28th July 2004, Putrajaya.

Abdullah R, Alizah Z, Wee YH, Leaw CL, Yeap CB, Yap WSP, Yeun LH, Rashdan MM, Joseph JL, Siti Azma J, Lee MP & Salwa AS. (2005). *Immature Embryo: A Useful Tool for Oil Palm Genetic Transformation Studies*. Electronic Journal of Biotechnology (in press).

Alizah Z & Abdullah R (1996). Transformation of oil palm (*Elaeis guineensis* J.) immature embryos by particle bombardment. In *Proc. of the 2nd National Congress on Genetics*. 13-15th November, Kuala Lumpur. pp 246-249.

Joseph JL, Salwa AS & Abdullah, R (2004). Early indication of bioplastic production in putative transformed oil palm mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In *Proceeding of 2004 MSMBB Scientific Meeting*, 19-21st July 2004, Melaka.

Rashdan MM, & Abdullah R (1999). *Agrobacterium-mediated transformation of oil palm (Elaeis guineensis J.)*. In *Proc. of the 5th International Conference on Plant Protection in the Tropics*. 15th March 1999, Kuala Lumpur. Pp 422-424.

Rashdan MM, Siti Azma J, Joseph JL, Yeun LH, Nik Marzuki S, Ismanizan I & Abdullah R

Agrobacterium-mediated transformation for the production of polyhydroxyalkanoates in oil palm. Paper presented at the 3rd MMBPP Workshop, 26-28th July 2004, Putrajaya.

Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second Edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Siti Azma J & Abdullah R (2004). Stability of transgenes in putative transgenic oil palm expressing polyhydroxyalkanoate (PHA) genes mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. In *Proceeding of 2004 MSMBB Scientific Meeting*, 19-21st July 2004, Melaka.

Studi Komputasi *Ab Initio* Tahap Awal Mekanisme Reaksi Oksidasi Metil-tercier-butileter (MTBE) yang Diawali Oleh Radikal OH

Rustaman¹⁾ dan Muhamad A. Martoprawiro²⁾

Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesa 10, Bandung, 40132, Indonesia

1) e-mail: s202rust@mail.chem.itb.ac.id

2) e-mail: muhamad@chem.itb.ac.id

Abstrak

Metil-tercier-butileter (MTBE) banyak digunakan sebagai aditif oksigenat pengganti timbal (Pb) pada bensin reformulasi dan oxyfuels. Studi komputasi *ab initio* tahap awal mekanisme reaksi oksidasi fasa gas MTBE yang diawali oleh radikal OH sudah dilakukan untuk memahami perilaku MTBE di atmosfer dan pada proses pembakaran. Penelitian dilakukan menggunakan metode perhitungan MP4/6-31G(d)//HF/6-31G(d) untuk menghitung energetika spesi-spesi yang terlibat dalam reaksi, yang digunakan untuk membangun diagram permukaan energi potensial dan meramalkan tetapan laju reaksi. Reaksi ditemukan terjadi melalui dua jalan abstraksi H oleh radikal OH, yaitu pada: gugus metoksi (reaksi-1) yang lebih disukai dan lebih bersifat eksoterm, dan melalui gugus *t*-butil (reaksi-2), dengan harga energi pengaktifan (E_a) dan entalpi reaksi (ΔH) masing-masing $E_{a1a} = 3,243$ kkal/mol, $E_{a1b} = 8,953$ kkal/mol, dan $\Delta H_{1a} = -13,502$ kkal/mol, $\Delta H_{1b} = -5,975$ kkal/mol. Tahap reaksi oksidasi dengan O_2 , reaksi-1 bereaksi tanpa hambatan energi sedangkan reaksi-2 melewati sedikit hambatan energi. Tetapan laju reaksi masing-masing tahap yang dihitung menggunakan teori keadaan transisi menunjukkan kesimpulan yang sama dengan peramalan diagram energi potensial yaitu: $k_{1a} = 5,420 \times 10^3$ L.mol⁻¹.detik⁻¹, $k_{1b} = 4,705 \times 10^{-1}$ L.mol⁻¹.detik⁻¹, $k_{2a} = 6,009 \times 10^5$ L.mol⁻¹.detik⁻¹ dan $k_{2b} = 1,909 \times 10^3$ L.mol⁻¹.detik⁻¹.

Kata kunci: MTBE, Metil *t*-butileter, *ab initio*, studi komputasi, reaksi oksidasi

1. Pendahuluan

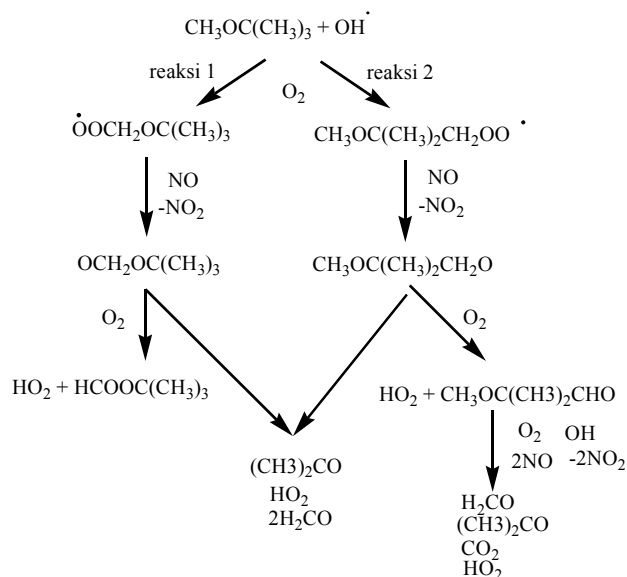
Metil-tercier-butileter (MTBE) banyak digunakan sebagai aditif oksigenat pengganti timbal (Pb) pada bensin reformulasi dan oxyfuels^{1,2} untuk meningkatkan bilangan oktan. Aditif oksigenat berfungsi membantu menurunkan emisi karbon monoksida dan hidrokarbon sisa yang tidak terbakar.³ MTBE memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan aditif oksigenat lainnya, di antaranya lebih murah, bercampur baik dengan bensin dan mudah ditransportasikan melalui pipa pembuangan.⁴

Di sisi lain, badan perlindungan lingkungan di Amerika Serikat, *Environmental Protection Agency* (EPA), telah merekomendasikan MTBE sebagai zat yang mungkin dapat menyebabkan kanker.⁵ Studi sifat racun dan kekarinogenan telah menghubungkan MTBE

dengan potensinya yang dapat mengganggu kesehatan manusia.

MTBE tidak bereaksi dengan ozon, tetapi bereaksi dengan radikal OH. MTBE dikenal bersifat mudah menguap dan mudah terurai jika diinisiasi oleh sinar UV di atmosfer.

Baru-baru ini Baldridge dkk. (2000), telah melakukan studi komputasi *ab initio* terhadap sifat dan struktur molekul MTBE dan senyawa analognya⁶, tetapi pemahaman tentang perilaku dan dampaknya terhadap lingkungan, karena mekanismenya yang rumit (Gambar 1), belum banyak diteliti, baik secara eksperimen maupun teoretis sehingga banyak aspek dari reaksinya belum terungkap dan mekanismenya yang lebih rinci belum diteliti. Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari mekanisme reaksi tahap awal oksidasi MTBE yang diawali oleh radikal



Gambar 1. Proses reaksi fotokimia oksidasi aditif oksigenat MTBE.⁶

OH secara teoretis menggunakan metode perhitungan orbital molekul *ab initio*.

2. Teori

2.1. Teori Gangguan Moller-Plesset⁷

Penyelesaian eksak persamaan Schrodinger hanya mungkin diperoleh untuk sistem-sistem yang sangat sederhana seperti atom H. Untuk sistem-sistem yang lebih kompleks diperlukan metode pendekatan. Dua metode pendekatan yang sudah sangat dikenal yaitu metode variasi dan teori gangguan.

Metode Hartree-Fock adalah salah satu metode pendekatan yang paling banyak digunakan. Metode ini menggunakan prosedur perulangan medan konsisten diri (*Self Consistent Field*) sistem berelektron banyak dalam potensial Coulomb dengan posisi inti tetap. Model Hartree-Fock mengabaikan korelasi kebolehjadian keberadaan elektron relatif terhadap elektron lainnya, yaitu suatu kenyataan bahwa kebolehjadian menemukan elektron pada suatu tempat dipengaruhi oleh elektron lainnya disebabkan adanya gaya tolakan antar elektron. Formalisme interaksi konfigurasi (*configuration interaction*) adalah suatu pendekatan sistematis untuk menangani korelasi elektron ini, tetapi perhitungan variasinya seringkali tidak mungkin diselesaikan. Pendekatan lain yang lebih praktis yaitu teori gangguan. Teori gangguan Moller-Plesset (*Moller-Plesset Perturbation Theory*, MPPT) menggunakan fungsi gelombang SCF dan MCSCF sebagai keadaan tanpa gangguan

dan menghitung korelasi elektron dengan cara gangguan.

Operator Fock untuk sistem n-elektron sebagai Hamilton tanpa gangguan, $H^{(0)}$,

$$H^{(0)} = \sum_i F(i) = \sum_i \left[h(i) + \sum_j J_j(i) - K_j(i) \right] \quad (1)$$

dari perbedaan antara Hamiltonian tanpa-gangguan yang dipilih dan Hamiltonian yang sebenarnya untuk sistem n-elektron, dapat diperoleh gangguan sebagai berikut:

$$V = \sum_{(<)} r_{ij}^{-1} - \sum_{i,j} (J_j(i) - K_j(i)) \quad (2)$$

akibatnya, energi tingkat ke-nol secara sederhana merupakan jumlah energi-energi orbital $\Psi^{(0)}$ yang terisi,

$$E^{(0)} = \left(\sum_i^n \varepsilon_i \right) = E_{orb} \quad (3)$$

Dengan menggunakan teori gangguan lebih lanjut dari Rayleigh-Schrodinger, koreksi orde pertama dan kedua dengan mudah diturunkan sebagai,

$$E^{(1)} = \langle \Psi^{(0)} | V | \Psi^{(0)} \rangle = -\frac{1}{2} \sum_{i,j} \langle ij | ij \rangle \quad (4)$$

$$E^{(2)} = \sum_{a<b,i<j} \frac{|\langle \Psi_0 | V | \Psi_{ij}^{(ab)} \rangle|^2}{E^{(0)} - E_{ij}^{ab}} = \sum_{a<b,i<j} \frac{|\langle ij | ab \rangle|^2}{\varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b} \quad (5)$$

dengan i, j sebagai orbital spin terisi, a, b orbital kosong pada $\Psi^{(0)}$ dan $\{\Psi_{ij}^B\}$ mewakili determinan Slater dengan energi tanpa-gangguan $\{E_{ij}^B\}$. Koreksi *Moller-Plesset Third Order* (MP3) dan *Moller-Plesset Fourth Order* (MP4) dapat dihitung dengan cara memperluas perlakuan di atas untuk memperbaiki energi yang dihitung tetapi dengan sendirinya biaya komputasi menjadi lebih mahal.

2.2. Himpunan Basis^{7,9}

Himpunan basis adalah deskripsi matematika dari sekumpulan orbital sistem yang telah diketahui, yang dikombinasikan untuk mendekati fungsi gelombang total dari sistem yang dikaji. Untuk mendapatkan orbital-orbital pendekatan yang lebih akurat digunakan himpunan basis yang diperbesar dengan tiga cara, yaitu:

1. Himpunan basis valensi terpisah (*split valence basis set*) yaitu dengan menambah jumlah fungsi basis per atom. Himpunan basis valensi terpisah, misalnya 3-21G dan 6-31G, memiliki dua (atau lebih) ukuran fungsi basis untuk tiap orbital valensi.
2. Himpunan basis terpolarisasi, yaitu: berbeda dengan himpunan basis valensi terpisah yang memperbolehkan ukuran orbital diubah tetapi bentuknya tetap. Himpunan basis terpolarisasi mengatasi kesulitan ini dengan menambahkan orbital-orbital yang momentum sudutnya lebih tinggi daripada yang dibutuhkan.
3. Himpunan basis fungsi baur (*diffuse functions*), yaitu: kekurangan himpunan basis terpolarisasi adalah ketidakmampuannya untuk menggambarkan molekul yang memiliki kerapatan elektron jauh dari inti, seperti anion atau molekul yang memiliki pasangan elektron bebas. Hal ini disebabkan amplitudo fungsi basis Gaussian agak rendah pada daerah jauh dari inti. Untuk mengatasi masalah ini digunakan fungsi baur. Himpunan basis fungsi baur ditandai oleh "+". 6-31+G(d) adalah himpunan basis 6-31G(d) dengan menambahkan fungsi baur pada atom non-hidrogen. Sedangkan 6-31++G(d), menambahkan fungsi baur juga pada atom hidrogen.

3. Metode Penelitian

3.1. Perangkat dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan komputer berprosesor ganda (*dualprocessor*) Intel Pentium III 800 MHz dengan RAM 1 GB di Laboratorium Kimia Teori dan Komputasi Departemen Kimia ITB dengan sistem operasi Linux Mandrake versi 10.0. Perangkat-perangkat lunak komputasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Chem3D (berbasis Windows), Gaussian98^{8,9} dan Molden¹⁰ (berbasis Linux).

3.2 Metode Perhitungan

Perhitungan komputasi molekul dilakukan dengan menggunakan metode struktur elektron *ab initio* pada tingkat MP4/6-31G(d)//HF/6-31G(d). Komputasi yang dilakukan meliputi: optimasi geometri, perhitungan frekuensi dan perhitungan energi satu titik (*single point energy*) pada semua spesi reaksi (pereaksi, senyawa antara, keadaan transisi dan hasil reaksi). Spesifikasi molekul sebagai data masukan diambil dari data keluaran hasil pra-optimasi menggunakan program Chem3D menggunakan metode perhitungan semi-empirik *Parametric Method 3* (PM3). Hal ini dilakukan agar waktu yang diperlukan untuk perhitungan optimasi geometri menggunakan Gaussian98 menjadi lebih efektif. Program Molden (berbasis Linux) dipakai untuk membantu menafsirkan struktur molekul yang dihasilkan program Gaussian98 (file teks) dengan cara menampilkannya secara visual.

Data-data energi hasil perhitungan dirajah pada diagram permukaan energi potensial (PEP) untuk mempelajari mekanisme reaksi yang terjadi dan dipakai untuk menghitung energi pengaktifan.

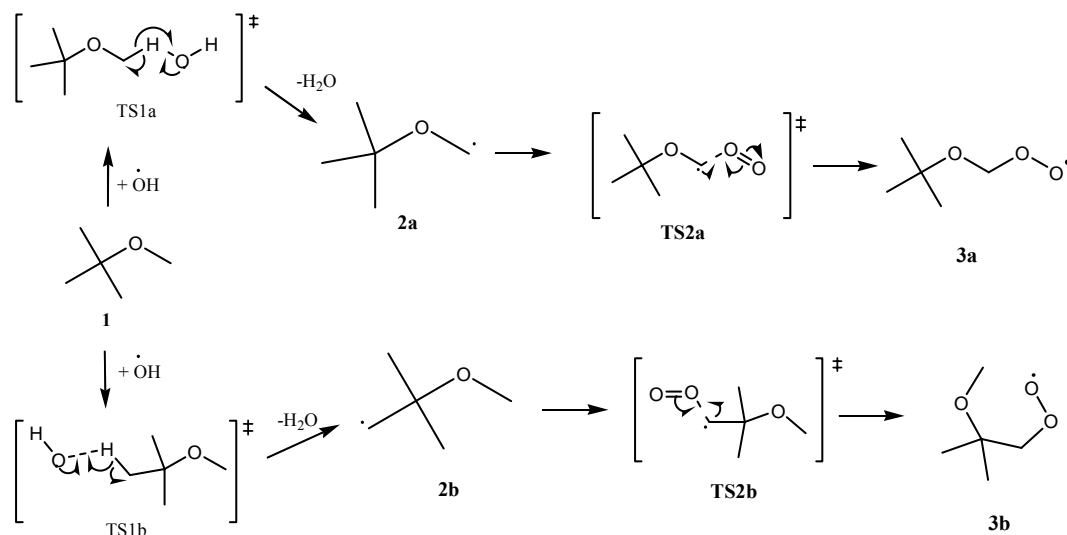
Tetapan laju reaksi dihitung menggunakan teori keadaan transisi¹¹ dari data hasil perhitungan frekuensi. Tetapan laju reaksi orde kedua dihitung dengan rumus:

$$k = \frac{k_B T}{h} \frac{Q^\ddagger}{Q} \exp\left(-\frac{E_c}{k_B T}\right) \quad (6)$$

di mana k_B adalah tetapan Boltzmann, T suhu, h tetapan Plank, Q fungsi partisi molekul dan E_c energi kritis.

4. Hasil dan pembahasan

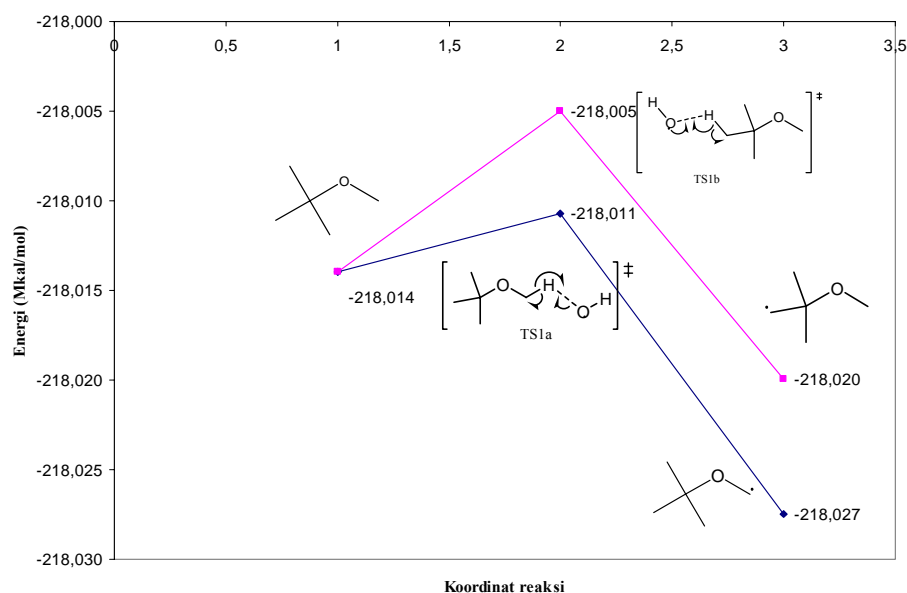
Pada Gambar 2, terlihat bahwa Mekanisme Reaksi oksidasi MTBE yang diawali dengan



Gambar 2 Tahap awal reaksi oksidasi MTBE yang diinisiasi radikal OH

Tabel 1. Energi pengaktifan dan tetapan laju reaksi hasil perhitungan menggunakan metode MP4/6-31G(d)//HF/6-31G(d)

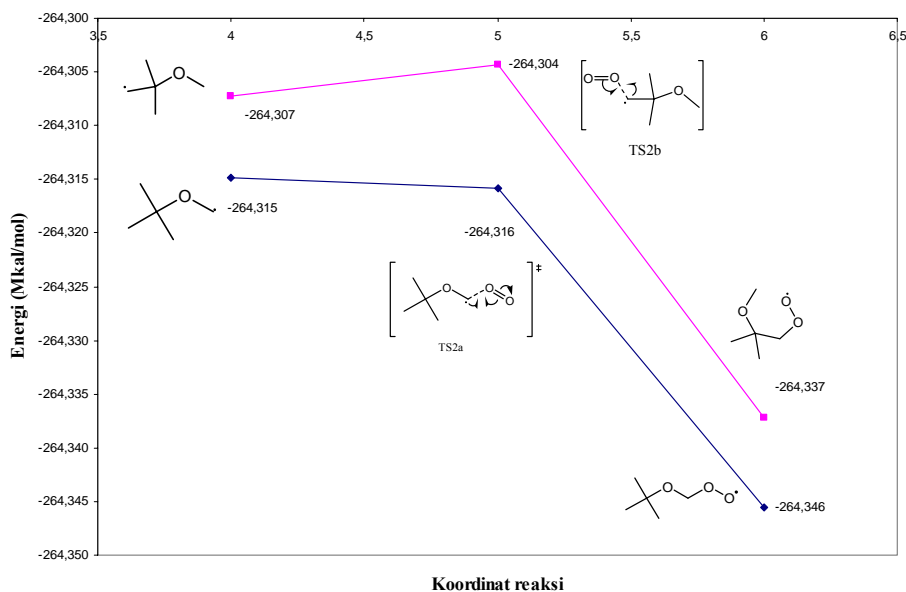
No	Spesi	E_a (kkal/mol)	k (L / mol.s)
1	TS1a	3,24265053	$5,420 \times 10^3$
2	TS1b	-1,00663408	$4,705 \times 10^{-1}$
3	TS2a	8,95310125	$6,009 \times 10^5$
4	TS2b	2,91229284	$1,909 \times 10^3$



Gambar 3 Reaksi abstraksi H pada MTBE oleh radikal OH

radikal OH dimulai dengan abstraksi H oleh radikal OH yang memiliki dua kemungkinan jalan yang dapat ditempuh, yaitu melalui gugus metoksi (reaksi-1) dan melalui gugus t-butil (reaksi-2). Hasil perhitungan dengan kimia

model MP4/6-31G(d)//HF/6-31G(d) menunjukkan bahwa reaksi-1 lebih disukai daripada reaksi-2 karena memiliki energi pengaktifan yang lebih kecil dibandingkan dengan reaksi-2 (Gambar 3), juga reaksi-1 lebih

Gambar 4 Reaksi radikal MTBE dengan O₂

eksoterm dibandingkan dengan reaksi-2. Hal ini mirip dengan hasil percobaan yang dilakukan oleh Atadinc *et al.*¹² Perilaku ini juga diperlihatkan dengan perbedaan harga tetapan laju reaksi yang diperoleh dari hasil perhitungan bahwa reaksi-1 memiliki harga tetapan laju reaksi (k) yang lebih besar daripada reaksi-2, dengan harga k masing-masing $k_{1a} = 5,420 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$ dan $k_{1b} = 4,705 \times 10^1 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$.

Reaksi selanjutnya yaitu antara radikal MTBE (**2a** dan **2b**) dengan O₂ juga memperlihatkan bahwa lintasan reaksi-1 lebih disukai terjadi daripada reaksi-2, hal ini terlihat dari diagram permukaan energi potensial (Gambar 4) bahwa reaksi-1 berlangsung tanpa melalui halangan potensial dengan energi pengaktifan negatif yaitu $Ea_{2a} = -1,660014 \text{ kkal/mol}$ sedangkan reaksi-2 berlangsung melalui halangan potensial dengan energi pengaktifan $Ea_{2b} = 2,91229 \text{ kkal/mol}$. Diduga struktur keadaan transisi **TS2a** yang memiliki posisi radikal yang diapit oleh dua atom oksigen memiliki struktur yang sangat tidak stabil dibandingkan dengan **TS2b** yang memiliki posisi radikal di antara atom O dan atom C.

Data tetapan laju reaksi hasil perhitungan juga memperlihatkan kecenderungan bahwa reaksi-1 lebih disukai daripada reaksi-2, dengan harga tetapan laju reaksi masing-masing $k_{2a} = 6,009 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$ dan $k_{2b} = 1,909 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$.

5. Kesimpulan dan Saran

5.1. Kesimpulan

Mekanisme reaksi abstraksi H oleh radikal OH lebih disukai dari gugus metoksi dan lebih bersifat eksoterm daripada dari gugus t-butil dengan dengan harga energi pengaktifan (Ea) dan entalpi reaksi (ΔH) masing-masing $Ea_{1a} = 3,243 \text{ kkal/mol}$, $Ea_{1b} = 8,953 \text{ kkal/mol}$, dan $\Delta H_{1a} = -13,502 \text{ kkal/mol}$, $\Delta H_{1b} = -5,975 \text{ kkal/mol}$.

Pada reaksi radikal MTBE dengan O₂, radikal MTBE pada gugus metoksi bereaksi tanpa hambatan energi sedangkan radikal MTBE pada gugus t-butil melewati sedikit hambatan energi.

Tetapan laju reaksi masing-masing tahap yang dihitung menggunakan teori keadaan transisi menunjukkan kesimpulan yang sama dengan peramalan diagram energi potensial yaitu: $k_{1a} = 5,420 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$, $k_{1b} = 4,705 \times 10^1 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$, $k_{2a} = 6,009 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$ dan $k_{2b} = 1,909 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{detik}^{-1}$.

5.2. Saran

Melakukan studi mekanisme lanjutan dari oksidasi MTBE yang telah dilakukan hingga menjadi fragmen-fragmen terkecilnya dan melakukan perhitungan menggunakan metode perhitungan yang lebih tinggi untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.

6. Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dalam bentuk beasiswa BPPS dan Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung.

7. Informasi Pendukung

Struktur lengkap setiap spesi yang terlibat dalam reaksi dapat dilihat di <http://research.chem.itb.ac.id/theocomp/20502010/>.

8. Daftar Pustaka

1. Chang, T.Y., Hammerle, R.H., Japar, S.M., Salmeen, I.T., *Environ. Sci. Tech.* 1991, 25, 1190-1197.
2. Japar, S.M., Wallington, T.J., Rudy, S.J., Chang, T.Y., *Environ. Sci. Technol.* 1991, 25, 415-420.
3. Wallington, T. J., Andino, J.M., Skewes, L.M., Siegl, W.O., Japar, S.M., *Chem. Rev.*, 1993, 93, 671.
4. Schaffer, K.L., Uchrin, C.G., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1997, 59, 744-749.
5. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), <http://www.epa.gov>, September 2002
6. Baldrige, K.K., Siegel, J.S., Gregerson, L.N., *J. Phys. Chem. A.* 2000, 104, 11106-11110.
7. Levine, I.N. (2000), *Quantum Chemistry*, Fifth Ed., Prentice Hall, New Jersey..
8. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Keith, T. A.; Petersson, G. A.; Montgomery, J. A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M. A.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Binkley, J. S.; DeFrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. GAUSSIAN98-DFT, Revision A.7; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
9. Foresman J.B., Frisch, A. (1996), *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 1st ed., Gaussian Inc., Pittsburgh, USA.
10. Schaftenaar, G. and Noordik, J.H. (2000), Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, 14, 123-134.
11. Steinfeld, J.I., Francisco, J.S., Hase, W.L. (1989), *Chemical Kinetics and Dynamics*, Prentice Hall, New Jersey.
12. Atadinc, F., Selcuki, C., Aviyente, V. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, 4, 1797-1806.

Pengembangan Sensor Amonium Dengan Teknik Fotopolimer dan Elektrod Bercetak Skrin

Sagir Alva, Lee Yook Heng, Musa Ahmad

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

¹⁾ Alamat surat menyurat: E-mail yhl1000@pkriscc.ukm.my

Abstrak

Kajian rekabentuk sensor ion amonium berasaskan kepada membran fotopolimer poli(n-butyl akrilat) telah dikerjakan menggunakan elektrod bercetak skrin (SPE) sebagai elektrod kerja. Kajian ini memberikan nilai Nernstian 55.2 ± 2.2 mV/dekad dengan julat pengesanan ion amonium 10^{-1} - 10^{-5} M dan had pengesanan $5.47 \times 10^{-5} \pm 1.53 \times 10^{-6}$ M. Sensor ion amonium ini mempunyai koselektifan yang tinggi daripada kation gangguan seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , Li^{+} dan juga Na^{+} . Pada kajian ini, sensor mempunyai kebolehasan yang baik (RSD 3.99%, $n = 3$).

Kata kunci : sensor amonium, elektrod bercetak skrin, fotopolimer, poli(n-butyl akrilat).

1. Pendahuluan

Dalam pengawalan pencemaran persekitaran sekarang ini, kaedah untuk pengukuran amonium mempunyai peranan yang besar. Kepekatan ion amonium dalam air minum tidak boleh melebihi 0.028mM, dan kepekatan amonia sebesar 1.5×10^{-3} mM sudah boleh menjadi toksik bagi organisma kecil, terutama ikan. Nisbah daripada ion amonium dan amonia bebas bergantung kepada pH, suhu dan saliniti air (Trinkel et al,1997). Selain daripada untuk pengawalan persekitaran, pengukuran ion amonium juga sangat penting dalam analisis makanan dan klinikal serta dalam aplikasi industri (Heng et al 2004, Trinkel et al 1996, Claudia et al 1996).

Kaedah spektrofotometri khususnya kaedah Nessler secara luas telah digunakan untuk menentukan amonia. Kaedah ini berasaskan kepada perubahan warna coklat yang tetap, dan terjadi akibat adanya tindak balas kimia antara ion NH_4^+ dengan reagen K_2HgI_4 (Gotterman,1978). Kaedah Nessler ini sering kali memerlukan pengasingan analit daripada sampel, sehingga memerlukan masa yang lebih lama dan lebih rumit. Selain daripada kaedah Nessler, pengukuran ion amonium dapat juga dilakukan dengan

menggunakan sensor (Trinkel et al,1997, Heng et al 2004, Trinkel et al 1996, Claudia et al 1996, Montalvo, 1973, Beer et al,1988).

Secara am, elektrod ion pemilih memerlukan membran pemilih ion yang merupakan suatu polimer yang mengandungi ionofor (Heng dan Hall,2000). Poli(vinil klorida) (PVC) merupakan membran pemilih ion konvensional. Membran ini mempunyai daya kelekatan yang rendah terhadap permukaan pepejal dan memerlukan pengwapan pelarut yang lebih lama dalam penyediaan membran(Heng dan Hall,1996, Abranova et al 1998, Robert et al 1999), serta memerlukan pemplastik sebagai pelembut (Heng et al, 2004). Kelemahan daripada membran ini boleh diselesaikan dengan mengguna membran ion pemilih tanpa pemplastik. Penggunaan membran tanpa pemplastik ini menjadi popular setelah kerja-kerja yang berasaskan kepada membran metakrilat-akrilat berjaya dilakukan (Heng et al, 2004, Heng dan Hall,1996, Heng dan Hall,2000, Heng et al 2002, Heng dan Hall,2001). Teknik fotopolimer dan membran tanpa pemplastik ini telah berjaya digunakan untuk pembuatan sensor potentiometri (Heng dan Hall,2001,Ambrose et al 1996) dan juga sensor optik (Heng et al,2003). Ia telah

menunjukkan prestasi yang cukup baik berbanding membran konvensional.

Polimer poli(n-butyl akrilat) mempunyai banyak kelebihan sebagai matriks membran untuk sensor ion. Polimer ini dapat bekerja tanpa menggunakan sebarang pemplastik dan boleh disediakan dengan teknik fotopolimer. Kelekatannya daripada polimer ini pada permukaan elektrod cukup baik, sehingga sesuai digunakan untuk berbagai aplikasi sensor ion dalam bentuk pepejal (Heng et al, 2004).

Salah satu teknologi elektrod sensor ion yang sedang berkembang setakat ini ialah elektrod bercetak skrin (*screen printed electrode*, SPE). Teknologi ini mempunyai berbagai kelebihan berbanding dengan elektrod konvensional, diantaranya seperti kos yang murah, pembuatan yang mudah, bentuk yang kecil serta digunakan secara pakai buang, kerana boleh dihasilkan secara masal (Robert et al 1999, Vidal et al, 1995, Wang et al, 1998). Selain daripada itu, teknologi ini boleh disediakan dalam bentuk susun atur, sehingga boleh mengukur berbagai spesies dalam sampel hanya dengan satu elektrod (Mourzina et al, 2001)

Langkah-langkah asas dalam pembuatan SPE ini ialah dengan melapisi suatu bahan elektrod secara planar dengan mengikuti pola pencetak yang telah direka bentuk. Bahan elektrod yang digunakan antara lain adalah emas, platinum, karbon ataupun Ag/AgCl. Selanjutnya, dilakukan proses termal untuk pengeringan (Wang et al, 1998). SPE telah banyak digunakan dalam berbagai aplikasi pembuatan sensor (Robert et al 1999, Vidal et al, 1995, Wang et al, 1998, Mourzina et al, 2001, Wang et al, 1993). Kajian ini bertujuan untuk merekabentuk suatu sensor ion amonium dengan menggunakan teknik fotopolimer dan SPE.

2. Percobaan

2.1. Bahan Kimia

Bahan membran seperti n-butyl akrilat, 2-heksanediodiakrilat dan 2,2-dimetoksil-2-fenilasetofenon, yang diperoleh daripada Sigma. Nonaktin, Natriumtetrakis[bis-3,5(trifluorometil) fenil] borat, tris(hidroksimetil)aminometan (Tris), litium asetat anhidrat, agar, garam klorida bagi kalium,

natrium amonium, magnesium, kalsium dan litium yang diperolehi daripada Fluka.

2.2. Peralatan

Meter ion Orion 420A, Elektrod SPE Ag/AgCl sebagai elektrod kerja, Elektrod rujukan jenis dua persimpangan dengan menggunakan litium asetat sebagai jambatan garam pepejal (Heng et al, 2004).

2.3. Penyediaan Sensor

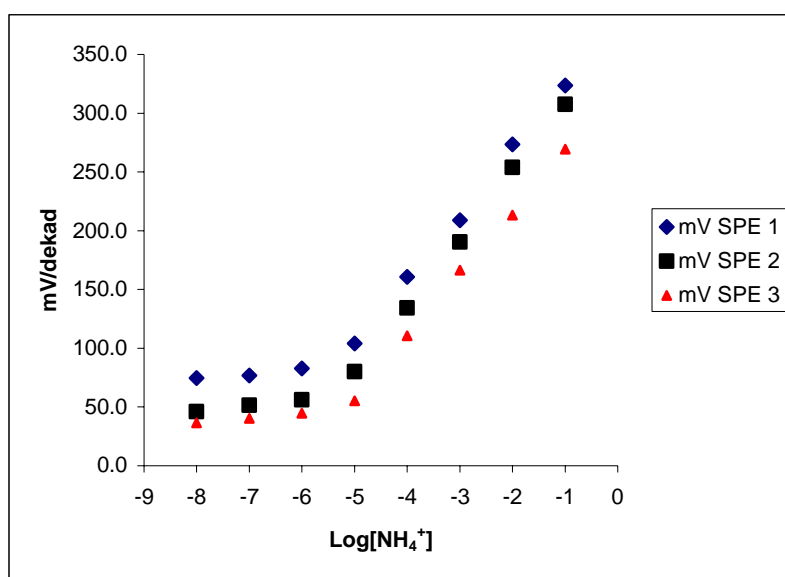
Disediakan suatu campuran poli(n-butyl akrilat) tanpa pemplastik. Campuran mengandungi monomer n-butyl akrilat, 0.1% w/w ejen taut silang 2-heksanediodiakrilat, 1.9 % w/w fotoinisiator 2,2-dimetoksil-2-fenilasetofenon, 2.4% w/w ionofor nonaktin dan 24 % mol (relatif kepada ionofor) daripada natrium tetrakis [bis-3,5(trifluorometil)fenil]borat. Selanjutnya campuran ini disalutkan di atas lapisan Ag/AgCl yang terdapat pada SPE, dan selanjutnya difotopolimer dalam kotak ultra lembayung (RS Ltd) dan di bawah aliran nitrogen selama 3 minit.

2.4. Penilaian Sensor

Sel elektrokimia yang dibina terdiri daripada elektrod rujukan Ag/AgCl dua persimpangan, seperti yang dilakukan oleh Heng dan Hall [8]. Larutan dalaman elektrod rujukan yang digunakan adalah 0.1 M Tris-HCl (pH = 7), di mana litium asetat digunakan sebagai elektrolit jambatan garam pepejal. Kedua-dua elektrod rujukan dan sensor amonium dihubungkan dengan Orion meter ion. Nilai perbezaan keupayaan daripada sel elektrokimia atau emf dalam mV dicatat setelah nilai yang stabil diperolehi (Heng et al, 2004). Kajian ion pengganggu dilakukan dengan menggunakan kaedah larutan berasingan (SSM) (IUPAC, 1994), dengan menggunakan 0.1 M larutan klorida daripada kalium, natrium, kalsium, magnesium serta litium sebagai ion pengganggu.

3.1. Hasil dan Pembahasan

Respon Nernstian terjadi ketika respon elektrod ion pemilih mengikuti keseimbangan termodinamik setempat. Respon Nernstian ditunjukkan oleh plot perbezaan keupayaan antara sel melawan logaritma keaktifan analit (a_A) adalah linear dengan kecerunan secara teori 59.16 mV/dekad pada suhu 298.15 K (IUPAC, 1994). Perubahan nilai emf sensor kalium ditunjukkan dalam rajah 1, untuk



Rajah 1. Respon sensor ion amonium yang dibuat dengan teknik fotopolimer serta menggunakan SPE.

Jadual 1. Prestasi sensor ion amonium berasaskan fotopolimer dan SPE

Sensor	Kecerunan (mV/dekad)	Julat Linear (M)	r ²	Had Pengesanan
SPE 1	55.2	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁵	0.9984	5.6 x 10 ⁻⁵
SPE 2	57.4	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁵	0.9993	5.5 x 10 ⁻⁵
SPE 3	53.0	10 ⁻¹ – 10 ⁻⁵	0.9992	5.3 x 10 ⁻⁵
Purata	55.5 ± 2.2			5.47 x 10 ⁻⁵ ± 1.53 x 10 ⁻⁶

Jadual 2. Selektiviti sensor ion amonium dengan membran tanpa pemplastik dalam kehadiran 0.1 M beberapa ion pengganggu.

Ion Pengganggu	Log K _{A,B} ^{pot}
K ⁺	-1.389 ± 0.02
Na ⁺	-3.000 ± 0.08
Ca ²⁺	-4.057 ± 0.22
Mg ²⁺	-4.083 ± 0.27
Li ⁺	-3.846 ± 0.15

perubahan kepekatan larutan ion amonium daripada 0.1 M hingga 10⁻⁸ M.

Respon yang diperlihatkan oleh sensor amonium ini adalah baik, dengan kebolehasilan yang memuaskan, iaitu 3.99% RSD (n = 3). Kebolehasilan yang baik ini menunjukkan bahawa elektrod SPE yang dipergunakan itu stabil. Ini disebabkan darjah kelekatan film fotopolimer poli(n-butyl akrilat) tanpa pemplastik pada permukaan SPE adalah kuat. Keadaan ini pernah dilaporkan sebelumnya (Borchardt, et al 1994). Kelekatan membran polimer pada permukaan elektrod yang baik akan menyebabkan membran tidak mudah terlucut dan ini akan meningkatkan persentuhan antara membran dengan elektrod.

Sensor amonium ini mempunyai julat kelinearan 0.1 hingga 10⁻⁵ M, dengan nilai kecerunan yang mendekati Nernstian, iaitu 55.5 ± 2.2 mV/dekad (n = 3) seperti dalam jadual 1. Prestasi sensor amonium ini adalah cukup baik, dan menyamai hasil yang pernah dilaporkan sebelum ini (Ambrose et al 1996, Abranova et al 2000).

Teknik fotopolimer yang digunakan dalam penyediaan poli(n-butyl akrilat) adalah sesuai walaupun tidak ada sebarang pemplastik digunakan. Ini disebabkan bentuk struktur daripada poli(n-butyl akrilat) yang cukup fleksibel (Heng et al, 2004), sehingga membolehkan terjadinya tindak balas kompleks antara ionofor nonaktif dengan ion amonium

dalam keadaan pepejal. Sensor amonium tanpa pemplastik ini memperlihatkan prestasi had pengesanan yang memuaskan, iaitu $5.47 \times 10^{-5} \pm 1.53 \times 10^{-6}$ M. Selektiviti sensor ion amonium dengan membran poli(n-butyl akrilat) tanpa pemplastik dengan kehadiran beberapa ion pengganggu utama, seperti yang diperlihatkan oleh jadual 2.

Keselektifan sensor kepada amonium adalah lebih tinggi daripada Ca^{2+} , Mg^{2+} , Li^{+} dan Na^{+} , tetapi rendah terhadap ion kalium. Ini disebabkan saiz ion amonium hampir sama dengan ion kalium (Chin et al 1999, Chin et al 2002).

4. Kesimpulan

Sensor ion amonium yang disediakan menggunakan teknik fotopolimer berasaskan bahan n-butyl akrilat tanpa pemplastik serta menggunakan elektrod SPE memberikan prestasi yang sebanding dengan polimer yang lain. Membran polimer yang digunakan dapat berfungsi, walaupun tanpa kehadiran sebarang pemplastik. Film poli(n-butyl akrilat) juga menunjukkan kelekatan yang kuat pada permukaan elektrod SPE yang digunakan. Ini meningkatkan prestasi sensor.

5. Ucapan Terimakasih

Penghargaan yang setingginya diberikan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi Malaysia, National Biotechnology Directorate dan juga kepada Universiti Kebangsaan Malaysia untuk bantuan kewangan melalui projek IRPA 09-02-02-006-EAR057 dan projek IRPA 09-03-03-0006NBD.

6. Rujukan

Abranova, N.Y., Bratov, A.V., Vlasov, Y.G., Bartoli, D., 1998. Photopolymerized polyacrylates as ion selective membranes of chemical sensors. *Journal of Analytical Chemistry* 53 (8) : 756 -761.

Abranova, N.Y., Borisov, Y., Bratov, A.V., Gavrilenko, P., Dominguez, C., Spiridonov, V., Suglobova, E., 2000. Application of an ion-selective field effect transistor with a photocured polymer membrane in nephrology for determination of potassium ions in dialysis solution and in blood plasma. *Talanta* 52 : 533-538.

Ambrose, T.M., Meyerhoff, M.E., 1996. Characterization of photopolymerized decyl methacrylate as a membrane matrix for ion-selective electrodes. *Electroanalysis* 8: 1095-1100.

Beer, D.D., and Den Heuvel, J.C.V., 1988. Response of ammonium selective microelectrodes based on

the neutral carrier nonactin. *Talanta*, vol 35. No 9 : 728-730.

Borchardt, M., Diekmann, C., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., 1994. Disposable sodium electrodes. *Talanta* vol 41, No 6 : 1025 – 1028.

Chin, J., Christian, W., Brents, S., 1999. A rotational approach to selective recognition of NH_4^+ over K^+ . *Angew Chemistry International Editions* 38: 2756 – 2759.

Chin, J., Oh, J., Jon, S.Y., 2002. Tuning and dissecting electronic and steric effects in ammonium receptors: nonactin Vs artificial receptors. *Journal American Chemical Society* 124 : 5374-5379.

Claudia, P., Gerhard, J.H., Ingo, K., Wolfbois, O.S., 1996. Ammonia fluorosensors based on reversible lactonization of polymer entrapped rhodamine dyes and effect of plasticizers. *Analytica Chimica Acta* 334 : 113-123.

Gotterman, H.L., 1978. Methods for physical and chemical analysis fresh water. *Oxford Blackwell Scientific Publications*.

IUPAC. 1994. Recommendation for nomenclature of ion selective electrodes. *Pure Applied Chemistry* 66 : 2527-2536.

Heng, L.Y., and Hall, E.A.H., 1996. Methacrylates-acrylate based polymers of low plasticizer content for potassium ion-selective electrodes. *Analytical Chimica Acta* 324 : 47-56.

Heng, L.Y., and Hall, E.A.H., 2000. Producing “self-plasticizing” ion selective membranes. *Anal. Chem.* 72 : 42-51.

Heng, L.Y., and Hall, E.A.H., 2000. One-step synthesis of K^+ -selective methacrylic-acrylic copolymer containing grafted ionophore and requiring no plasticizer. *Electroanalysis* 12: 178-186.

Heng, L.Y., and Hall, E.A.H., 2000. Taking the plasticizer out of methacrylic-acrylic membranes for K^+ -selective electrodes. *Electroanalysis* 12 : 187 -193.

Heng, L.Y., and Hall, E.A.H., 2001. Assessing a photocured self-plasticised acrylic membrane recipe for Na and K ion selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* 443 : 25-40.

Heng, L.Y., Chern, L.H., Ahmad, M. 2002. A hydrogen ion selective sensor based on non-plasticised methacrylic-acrylic membranes. *Sensors* 2 : 339-346.

Heng, L.Y., Fang, T.H., Chern, L.H., Ahmad, M. 2003. Influence of methacrylic-acrylic copolymer composition on plasticizer-free optodes films for pH sensors. *Sensors* 3 : 83-90.

- Heng,L.Y., Alva,S., Ahmad,M. 2004. Ammonium ion sensor based on photocured and self-plasticising acrylic films for analysis of sewage. *Sensors and Actuator B* 98 : 160-165.
- Montalvo,J.G.Jr., 1973. Ammonium ion specific electrode. *Analytica Chimica Acta* 65: 189-197.
- Mourzina,Y.G., Schuber,J., Zander,W., Legin,A., Vlasov,Y.G., Luth,H., Schoning,M.J., 2001. Development of multisensor system based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ion in complex solutions. *Electro.Chim.Acta* 47 : 251-258.
- Robert,K., Glab,S., Dziwulska,J., Palchetti,I., Mascini,M., 1999. Disposable strip potentiometric electrodes with solvent-polymeric ion-selective membranes fabricated using screen printing technology. *Analytica Chimica Acta* 385: 451 – 459.
- Trinkel,M., Trettnak,W., Reininger,F., Benes,R., Oleary,P., Wolfbois,O.S., 1996. Study of the performance of an optochemical sensor for ammonia. *Analytica Chimica Acta* 320 : 235-243.
- Trinkel,M., Trettnak,W., Reininger,F., Benes,R., Oleary,P., Wolfbois,O.S., 1997. Optochemical sensor for ammonia based on lipophilized pH indicator in hydrophobic matrix. *Intern.J. Environ. Anal. Chem* vol 67 : 237-251.
- Vidal,C.A.G., Munoz,J., Dominguez,C., Alegret,S., 1995. Chemical sensors, biosensors, and thick-film technology. *Trends in Analytical Chemistry* vol 14, No 5 : 225-231.
- Wang,J., Tian,B., 1993. Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury. *Analytica Chimica Acta* 274 : 1-6.
- Wang,J., Tian,B., Nascimento,V.B., Agnes,L. 1998. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electro.Chim.Acta* vol 43, No 23: 3459-3465.

Resveratrol Dimers From *Hopea Dryobalanoides*: Cytotoxic Effects And Chemotaxonomic Significance

Sahidin,^a Euis H. Hakim,^a Yana M. Syah,^a Lia D. Juliawaty,^a Sjamsul A. Achmad,^{a*}
Laily B. Din,^b Jalifah Latip^b

^a Natural Products Research Group, Chemistry Departement, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10 Bandung 40132, Indonesia.

^b School of Chemical Sciences & Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E., Malaysia.

Abstrak

Empat dimer resveratrol telah berhasil diisolasi dari kulit batang *H. dryobalanoides*, yaitu (-)-balanokarpol, (+)-parviflorol, (-)-hopeafuran, dan (-)-heimiol A. Struktur molekul senyawa-senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan data spektroskopi, yang meliputi spektrum UV, IR, NMR 1-D, dan NMR 2-D. Pengujian sifat sitotoksik keempat senyawa tersebut terhadap sel murin leukemia P-388 menghasilkan nilai IC₅₀ berturut-turut 14,3, 65,3, 52,0 dan > 100 ppm. Keberartian penemuan senyawa-senyawa tersebut pada kemotaksonomi *Hopea* juga dibahas pada makalah ini.

Kata Kunci : dimer resveratrol, *H. dryobalanoides*, *Dipterocarpaceae*, sel murin leukemia P-388.

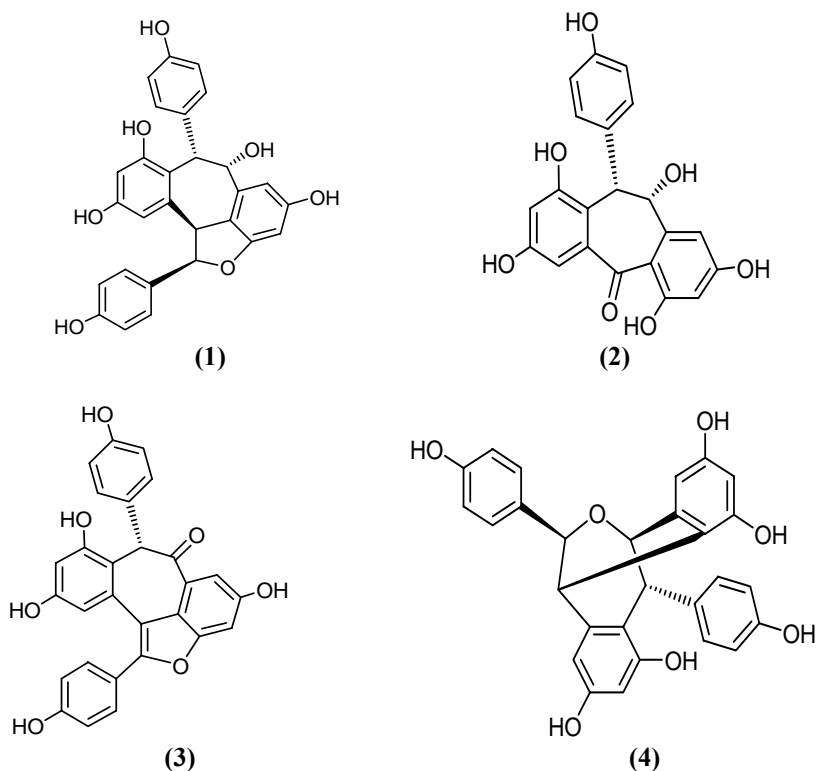
1. Introduction

Resveratrol oligomer has been known to be contained in a number of plant families, including Cyperaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Leguminosae, and Vitaceae (Sotheeswaran, 1993). Different oxidative condensation of the resveratrol monomer produced various size of oligomers, from dimer up to octamer resveratrols. Further modification of the oligomers is also known and is exemplified by the structures of hopeafuran (Tanaka et.al., 2001), heimiol A (Weber et.al., 2001) and parviflorol (Tanaka et.al, 2000). Because of the limited number of such oligomers, the presence of the modified oligomers could be of chemotaxonomic significance.

The resveratrol oligomers also showed interesting biological activities, it includes antifungal (Pryce et.al., 1977), antibacteri (Nitta, 2002), antiinflammation (Kitanaka et.al., 1990), and cytotoxic. The cytotoxic effect of some oligomers receives more attention by some researchers and resulted that vaticanol C,

a tetramer resveratrol, showed strong cytotoxic effects against murin tyrosinase cells (Ohguchi et.al, 2003), HL60 and SW480 cells (Ito et.al, 2003). The cytotoxicity of resveratrol oligomer on murine leukemia P-388 cells is, however, still limited. Therefore, testing of the oligomers on the P-388 cells could be of interesting.

Hopea dryobalanoides Dyer, locally known as "selangan daun kapur", has the same morphology as *H. ferruginea* Parijs. which it major distribution covers Malay-Peninsula, Sumatra, and Kalimantan (Wood, G.H.S., 1964). Until now, there was no report on the chemical constituents of this species. This paper will report the isolation and structure elucidations of (-)-balanocarpol (**1**), (+)-parviflorol (**2**), (-)-hopeafuran (**3**), and (-)-heimiol A (**4**) isolated from the tree bark of *H. dryobalanoides*, as well as their cytotoxicities against P-388 cells. In addition, their biogenesis and chemotaxonomy relationships will also be discussed.



2. Experimental

General procedures. The following instruments were used : melting point were measured by 'micro melting point apparatus'. Optical rotations, Perkin-Elmer 341 polarimeters in MeOH. UV spectra, Cary Varian 100 Conc and IR spectra, Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometers. ^1H dan ^{13}C NMR spectra, JEOL ECP400 spektrofotometers, 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C). The following adsorbents were used for purification : Vacuum liquid chromatography (VLC), Si-gel 60 GF₂₅₄ (Merck), Flash column chromatography (FCC), Si-gel G₆₀ (230-400 mesh) (Merck), Radial chromatography (RC), Si-gel 60 PF₂₅₄ (Merck), and TLC plates, Kieselgel 60 F₂₅₄ 0,25 mm (Merck). All solvents were distilled technical qualities.

Plants material. Stem bark of *H. dryobalanoides* Miq., was collected from Kebun Percobaan Haurbentes, Jasinga, Bogor, Jawa Barat, and identified by Herbarium Bogoriense staffs, Bogor.

Extraction and Isolation. Dried stem bark of *H. dryobalanoides* (2.5 kg) was extracted successively with acetone (3 x 24h x 5 L). The

extract was concentrated to yield 270 g residue. A part of the extract (100 g) was dissolved again in solvent MeOH-diethylether to produce brown MeOH-diethylether extract (55 g) and sediment of tannin (45 g). Extract MeOH-diethylether (25 g) was subjected to VLC with column Φ 10 cm, adsorbent Si-gel (250 g) and eluted with mixture hexane-ethylacetate (7:3) – ethylacetate (100%), and MeOH (100%), to give 6 fractions (F₁-F₆). The weight of the fraction (F₁-F₆) were 1.4 g, 0.5 g, 3.2 g, 7.9 g, 6.9 and 5.2 g, respectively. The major component of F₁ and F₂ were terpenoids. F₃ was purified by using RC (Si-gel, hexane-ethylacetate = 1 : 1, and hexane: CHCl₃:MeOH = 4:5:1) to give compound **2** (385 mg). Compound **3** (240 mg), **1** (320 mg), and **4** (105 mg) were obtained by purification of F₄ using RC (Si-gel), which eluted with mixture of hexane-ethylacetate = 4:6(**3**), mixture of CHCl₃:MeOH = 8.5:1.5 (**1**), and mixture of hexane:CHCl₃:MeOH = 7:1.5:1.5 (**4**).

Biological activities. Activities of the resveratrol dimers were tested using murin leukemia P-388 cells (Alley, 1988).

(-)-*Balanocarpol* (**1**) was obtained as yellow amorphous powder, mp. 180 - 183 °C, $[\alpha]_D^{20}$ -

54° (c 0.1 MeOH), UV absorption λ_{maks} (MeOH) 227 (4.64), 284 nm (4.05), showed bathochromic shift (MeOH + NaOH), IR spectrum (cm^{-1}) 3352 (OH), 1613, 1513 and 1346 (C=C benzene), and 834 (*para*-disubstituted benzene). ^1H NMR spectrum (aseton- d_6 , 399.78 MHz) δ_{H} (ppm): 7.48 (2H, *d*, $J=8.4$, H-2/6a); 6.94 (2H, *d*, $J=8.4$, H-3/5a); 6.73 (2H, *d*, $J=8.4$, H-2/6b), 6.41 (2H, *d*, $J=8.4$, H-3/5b), 6.24 (1H, *d*, $J=2.2$, H-14b), 6.18 (1H, *br s*, H-12b), 6.09 (1H, *d*, $J=1.1$, H-12a), 5.95 (1H, *d*, $J=2.2$, H-14a), 5.69 (1H, *d*, $J=9.5$, H-7a), 5.38 (1H, *br s*, H-8b), 5.15 (1H, *d*, $J=9.5$, H-8a), 4.89 (1H, *br s*, H-7b), and OH {4.41 (1H, *br d*), 8.65, 8.09, 8.06, 7.91, 7.81 (*br s*)}. ^{13}C NMR spectrum (aseton- d_6 , 100.53 MHz) δ_{C} (ppm): 133.2 (C-1a), 131.3 (C-2(6)a), 113.9 (C-3(5)a), 155.5 (C-4a), 50.0 (C-7a), 72.9 (C-8a), 140.6 (C-9a), 113.6 (C-10a), 159.5 (C-11a), 94.8 (C-12a), 158.9 (C-13a), 104.2 (C-14a), 133.4 (C-1b), 130.3 (C-2/6a), 116.2 (C-3/5b), 158.3 (C-4b), 93.3 (C-7b), 58.3 (C-7b), 142.6 (C-9b), 120.2 (C-10b), 157.2 (C-11b), 101.8 (C-12b), 156.5 (C-13b), and 106.5 (C-14b).

Hopeafuran (**3**), a yellow amorphous powder, mp. 204 - 206 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +21^\circ$ (c 0.1 MeOH), UV absorption λ_{maks} (MeOH) 396 nm, showed bathochromic shift (MeOH + NaOH). IR spectrum (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}) 3365 (OH), 1613, 1512, and 1451 (C=C benzene), and 833 (*para*-disubstituted benzene). ^1H NMR spectrum (aseton- d_6 , 399.78 MHz) δ_{H} (ppm): 7.69 (2H, *d*, $J=8.8$, H 2/6a), 7.32 (1H, *d*, $J=2.2$, H 14b), 7.03 (1H, *d*, $J=2.2$, H 12b), 6.97 (2H, *d*, $J=8.8$, H 3/5a), 6.84 (2H, *d*, $J=8.8$, H 2/6b), 6.69 (1H, *d*, $J=2.5$, H 14a), 6.56 (1H, *d*, $J=2.5$, H 12a), 6.54 (2H, *d*, $J=8.8$, H 3/5b), 6.11 (1H, *br s*, 7b), OH {8.87 (*br s*, 1 H, H-4a), 8.74 (*br s*, 1 H, H-11a), 8.32 (*br s*, 1 H, H-13a), 7.94 (*br s*, 1 H, H-4b), and 8.75 (*br s*, 1 H, H-13b)}.

Heimiol A (**4**), a yellow amorphous powder, mp. 229 - 231 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 17^\circ$ (c 0.1 MeOH), UV absorption (MeOH) λ_{maks} (log ϵ) 226 (4.70), and 283 nm (4.10), showed bathochromic shift (MeOH + NaOH). IR spectrum (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}) 3306 (OH), 1613, 1512, and 1455 (C=C benzene), and 838 (*para*-disubstituted benzene). ^1H NMR spectrum (aseton- d_6 , 399.78 MHz) δ_{H} (ppm) 7.14 (2H, *d*, $J=8.4$ Hz, H-2/6b): 6.91 (2H, *d*, $J=8.8$ Hz, H-2/6a), 6.72 (2H, *d*, $J=8.4$ Hz, H-3/5b), 6.61 (2H,

d, $J=8.8$ Hz, H-3/5a), 6.49 (1H, *d*, $J=2.2$ Hz, H-14b), 6.40 (1H, *d*, $J=2.6$ Hz, H-14a), 6.25 (1H, *d*, $J=2.2$ Hz, H-12b), 6.15 (1H, *d*, $J=2.2$ Hz, H-12a), 4.98 (1H, *d*, $J=3.2$ Hz, H-8b), 5.58 (1H, *br s*, H-7a), 4.33 (1H, *d*, $J=3.2$ Hz, H-7b), 4.24 (1H, *br s*, H-8a). -OH {8.18 (2H, *s*), 8.12 (1H, *s*), 8.07 (2H, *d*, $J=4.0$ Hz), 7.59 (1H, *s*)}. ^{13}C NMR spectrum (aseton- d_6 , 100.53 MHz) δ_{C} (ppm) 157.8 (C-11b), 157.6 (C-13a), 157.6 (C-13b), 157.5 (C-4a), 156.6 (C-4b), 147.5 (C-11b), 155.1 (C-11a), 147.5 (C-9b), 143.1 (C-9a), 137.4 (C-1a), 137.7 (C-1b), 130.5 (C-2/6a), 128.4 (C-2/6a), 117.3 (C-10b), 116.6 (C-10a), 115.8 (C-3/5b), 115.7 (C-3/5a), 107.7 (C-14a), 105.1 (C-14b), 102.7 (C-12b), 102.5 (C-12a), 81.9 (C-8b), 81.8 (C-7a), 51.3 (C-7b), dan 47.4 (C-8a).

3. Results and Discussions

Compound **2**, a yellow amorphous powder, mp. 172 -176 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +122^\circ$ (c 0.1 MeOH), showed UV absorption at λ_{maks} 222 nm (4.99), 339 nm (4.27), characteristic for an extended conjugation of a phenolic chromophore. The maxima were shifted to the longer wavelengths on addition NaOH. The IR spectrum of **2** exhibited the presence of hydroxyl (3350 cm^{-1}), carbonyl (1649 cm^{-1}), and aromatic (1614 , 1512 , and 1456 cm^{-1}) groups, including also the absorption for *para*-disubstituted benzene (837 cm^{-1}). The ^{13}C NMR spectrum of **2** (Table 1) showed 19 well separated signals for 21 carbons, which is distributed into 5 C-oxyaryl, 13 C-aromatic, 1 C-carbonyl, and 2 C-aliphatic carbons. Assuming that the compound is a resveratrol oligomer, these spectroscopic data suggested **2** is a modified dimer resveratrol by the loss of benzyl moiety. Supporting these data, the ^1H NMR spectrum of **2** (Table 1) exhibited a few aromatic signal that represented a *p*-hydroxyphenyl (δ_{H} 6.85 and 6.48 ppm, respectively), two pairs of *meta* coupled proton for 1.2.3.5-tetrasubstitutedbenzen unit (δ_{H} 7.40 and 6.73 ppm, 6.75 and 6.09 ppm) and two aliphatic proton signals at δ_{H} 5.30 and 5.15 ppm for 1.2.2-tetrasubstitutedethanol. In addition, ^1H NMR spectra of **2** showed an aliphatic hydroxyl proton signal at δ_{H} 5.30 ppm, four phenolic proton signal at δ_{H} 8.01, 8.61, 8.79, 9.35 ppm and a chelated phenolic proton signal at δ_{H} 14.13 ppm. According to these structural units and comparison of the data with those reported in literatures, **2** is similar to parviflorol or hemsleyanol E. Parviflorol has *cis*

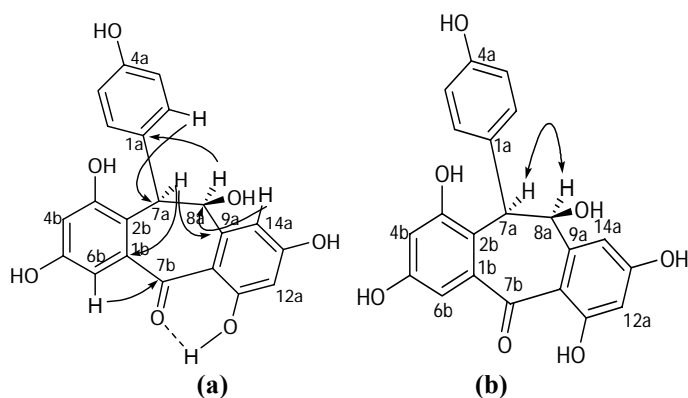


Figure 1. HMBC (a) and NOESY (b) spectra of compound 2

Table 1. The NMR Spectra of **2** (**1**), Parviflorol (**1***)⁴ and Hemsleyanol E (**1****)³

No	¹ H NMR			¹³ C NMR		
	1	1*	1**	1	1*	1**
1a				130,7	131,1	132,6
2 (6)a	6,85 (<i>d</i> , 8,1)	6,86 (<i>br d</i> , 8,6)	6,80 (<i>d</i> , 8,6)	130,0	130,5	129,9
3 (5)a	6,48 (<i>d</i> , 8,8)	6,49 (<i>d</i> , 8,6)	6,56 (<i>d</i> , 8,6)	114,5	115,0	115,5
4a	-	-	-	155,7	155,8	156,2
7a	5,15 (<i>br s</i>)	5,15 (<i>br s</i>)	6,24 (<i>d</i> , 6,2)	47,9	48,4	47,5
8a	5,30 (<i>br s</i>)	5,32 (<i>br s</i>)	5,14 (<i>br d</i> , 6,2)	74,3	74,8	79,0
9a	-	-	-	148,1	148,8	147,0
10a	-	-	-	111,2	111,7	111,5
11a	-	-	-	168,5	168,8	167,6
12a	6,09 (<i>d</i> , 2,9)	6,10 (<i>d</i> , 2,5)	6,18 (<i>d</i> , 2,0)	101,7	102,1	103,0
13a	-	-	-	164,1	164,5	163,5
14a	6,75 (<i>br d</i> , 2,8)	6,74 (<i>br d</i> , 2,5)	6,04 (<i>d</i> , 2,0)	106,7	107,1	108,0
1b	-	-	-	141,1	141,5	141,5
2b	-	-	-	121,7	122,1	119,5
3b	-	-	-	155,5	156,2	156,9
4b	6,73 (<i>d</i> , 2,6)	6,73 (<i>d</i> , 1,9)	6,69 (<i>d</i> , 2,0)	107,7	108,1	109,8
5b	-	-	-	156,8	157,2	157,7
6b	7,40 (<i>d</i> , 2,6)	7,41 (<i>d</i> , 1,9)	7,44 (<i>d</i> , 2,0)	110,0	110,5	111,5
7b	-	-	-	195,1	195,7	196,4
OH	5,30 (<i>br s</i>) 8,01; 8,61; 8,79; 9,35 (each <i>br s</i>) 14,13 (<i>s</i> ; C- 3b)	5,20 (<i>d</i> , 4,0; C- 8a) 7,87; 8,48; 8,65; 9,15 (each <i>br s</i>) 14,10 (<i>s</i> ; C-3b)	4,53 (<i>br s</i> , C8a,1H) 8,02 (<i>br s</i> , 1H) 8,50 (<i>br s</i> , 3H) 13,34 (<i>s</i> , 1H)			

*Tanaka, T., 2000; **Ito, T., 2001

orientations at H-7a and H-8a, while hemsleyanol E showed *trans* orientations. The NOESY spectrum of **2** showed the orientation of H(7a) and H(8a) of **2** was *cis*, therefore **2** is parviflorol.

Comparison of NMR data of **2** with those of parviflorol and hemsleyanol E further confirmed the structure of **2** (Table 1).

Using the same methodology as that of **2**, it can be concluded that **1** is (-)-balanocarpol (Tanaka, 2000), **3** is (-)-hopeafuran (Tanaka, 2001), and **4** is heimiol A (Weber, 2001).

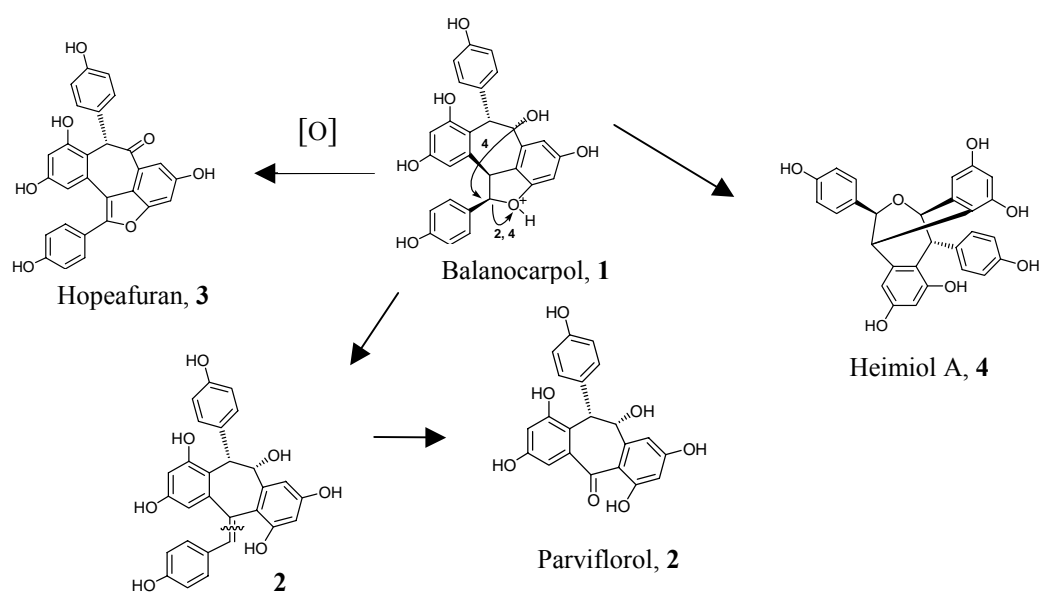


Figure 2

The cytotoxic activities of (-)-balanocarpol (**1**), (+)-parviflorol (**2**), (-)-hopeafuran (**3**), and (-)-heimiol A (**4**) were determined against murine leukemia P-388 cells. The IC_{50} value of all compounds were 14.3, 65.3, 52.0, and > 100 ppm, respectively. Comparing the activities of compounds **1-4** revealed that compound **1** was the most active on murine leukemia P-388 cells compared to the others. Structures modification by oxidation of resveratrol dimers on the dihydrobenzofuran moiety and cycloheptadiene skeleton tended to reduce the activity of the compounds toward murine leukemia P-388 cells.

Biogenesis

(The biogenesis is shown in figure 2)

Chemotaxonomy Significance

While compounds **1-3** have been isolated previously from the plant of same genus (Sotheeswaran., et.al., 1985; Jin-Rui Dai et.al.,1998, Tanaka et.al., 2000, 2001, Tukiran, 2004), compound **4** was isolated for the first time from *Hopea*. Compound **4** has been reported previously from *Neobalanocarpus heimii* (Weber et.al., 2001). Stereoisomers of balanocarpol, i.e. ampelopsin A and hemsleyanol A, had been isolated in a few species of *Shorea* (Aminah, N.S. et.al., 2002, Ito T. et.al., 2000). Hemsleyanol E, a stereoisomer of parviflorol, was found also in *S. hemsleyana* (Ito T. et.al, 2001), while the

stereoisomer of hopeafuran, shoreaphenol had been identified in *S. robusta* (Sharaswathy et.al., 1992). The above data suggested a close relationship between *Hopea*, *Shorea*, and *Neobalanocarpus*. Based on morphological data, *Hopea*, *Shorea*, and *Neobalanocarpus* were grouped to the same subgenera, *Shoreae* (Ashton, 1983). In addition, from this study, as well as previous reported data, the species of *Hopea* tends to yield resveratrol dimers.

4. Conclusion

Four resveratrol dimers have been isolated from the acetone extract of the stem barks of *H. dryobalanoides*, i.e. (-)-balanocarpol, (+)-parviflorol, (-)-hopeafuran, and (-)-heimiol A. The structures of these compounds were determined based on spectroscopic data. Structures modification by oxidation of resveratrol dimers on the dihydrobenzofuran moiety and cycloheptadiene skeleton tended to reduce the activity of the compounds toward murine leukemia P-388 cells. The resveratrol oligomers data suggested a a close relationship between *Hopea*, *Shorea*, and *Neobalanocarpus*.

5. Acknowledgements

We would like to thank the Department of National Education, republic of Indonesia for the financial support (BPPs), and Head of Kebun Percobaan Jasinga, Bogor, West Java for supplying the sample. We are also very

thankful for the Herbarium Bogoriense staffs, Bogor, for the identification of the sample.

6. References

- Alley, M.C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R., 1988, "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay", *Cancer Research*, **48** : 589-601.
- Aminah, N.S., Achmad, S.A., Aimi, N., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Kitajima, M., Syah, Y.M., Takayama, H., 2002, "Diptoindonesin A, a new C-glucoside of ϵ -Viniferin from *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae)", *Fitoterapia*, **73** :501-507.
- Ashton, P. S., 1983, *Flora Malesiana*, Martinus Nijhoff, London.
- Ito, T., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Matsumoto, K., Tanaka, T., Iinuma, M., Nozawa, Y., 2003, "Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C", *Carcinogenesis*, **24** (9) : 1489-1497.
- Ito, T., Tanaka, T., Ido, Y., Nakaya, K., Iinuma, M., Riswan, S. 2001, "Stilbenoids isolated from stem bark of *Shorea hemsleyana*", *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (7), 1001-1005.
- Kang, H. J., Park, H. Y., Choi, S. W., Yang, E. K., and Lee, W. J., 2003, "Resveratrol derivatives potently induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells", *Experimental and Molecular Medicine*, **35** (6) : 467-474.
- Kitanaka, S., Ikezawa, T., Yasukawa, K., Yamanouchi, S., Takido, M., Sung, H. K., and Kim, I. H., 1990, "(+)- α -Viniferin, an Anti-inflammatory Compound from *Caragana chamlagu* Root", *Chem. Pharm. Bull.*, **38**(2):432-435.
- Nitta, T., Arai, T., Takamatsu, H., Inatomi, Y., Murata, H., Iinuma, M., Tanaka, T., Ito, T., Asai, F., Ibrahim, I., Nakanishi, T., and Watanabe, K., 2002, "Antibacterial Activity of Extracts Prepared from Tropical and Subtropical Plants on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*", *J. of Health Science*, **48**(3):273-276.
- Ohguchi, K., Tanaka, T., Ito, T., Iinuma, M., Matsumoto, K., Akao, Y., Nozawa, Y., 2003, "Inhibitory Effects of Resveratrol Derivatives from Dipterocarpaceae Plants on Tyrosinase Activity", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67** (7):1587-1589.
- Pryce, R. J., Langcake, P., 1977, " α Viniferin : An Antifungal Resveratrol Trimer from Grapevines", *Phytochemistry*, **16** : 1452-1454.
- Sotheeswaran, S., Pasupathy, V. 1993, "Distribution of resveratrol oligomers in plants", *Phytochemistry* **32** (5), 1083-1092.
- Tanaka, T., Ito, T., Ido, Y., Son, T.K., Nakaya, K., Iinuma, M., Ohyama, M., Chelladurai, V., 2000, "Stilbenoids in stem bark of *Hopea parviflora*", *Phytochemistry*, **53**, 1009-1014.
- Tanaka, T., Ito, T., Ido, Y., Nakaya, K., Iinuma, M., Chelladurai, V., 2001, "Hopeafuran and a C-Glucosyl Resveratrol Isolated from Stem Wood of *Hopea utilis*", *Chem. Pharm. Bull.*, **49** (6) 785-787.
- Tukiran, 2004, "Senyawa Mikromolekul dari Beberapa Tumbuhan Meranti (*Shorea*) Indonesia", Disertasi, ITB, Bandung.
- Weber, J. F., et.al., 2001, "Heimiol A, a new dimeric stilbenoid from *Noebalanocarpus heimi*", *Tetrahedron Letter* **42** : 4895-4897.
- Wood, G.H.S., and Meijer, W., 1964, *Dipterocarps of Sabah*, Sabah Forest Record No. 5, Forest Departement, Sandakan.

Pembuatan Glukose Dari Bagas Secara Enzimatik Dengan Perlakuan Pendahuluan

Saraswati¹⁾

1) Jurusan Teknik Kimia, ITS
Kampus ITS Sukolilo, Surabaya, 60111, Indonesia
e-mail: saraswati_pde@yahoo.com

Abstrak

Bagas merupakan limbah organik dari pabrik gula. Kandungan selulosanya cukup tinggi sehingga bagas dapat dimungkinkan sebagai bahan baku pembuatan glukosa dengan proses hidrolisa. Dalam penelitian ini sebelum dilakukan proses hidrolisa dengan enzim, dilakukan proses pretreatment secara kimia terlebih dahulu. Variabel pada proses pretreatment : jenis pretreatment agent (NaOH dan H₂SO₄) dan konsentrasinya (1%; 3%; 5%). Variabel pada hidrolisa enzimatik adalah perbandingan enzim selulase terhadap bagas dengan larutan buffernya (0.1; 0.05; 0.005 ml enzim selulase)/gram (bagas + buffer). Pretreatment dilakukan pada suhu 121°C selama 30 menit sedang hidrolisa dengan enzim selulase pada suhu 50°C sampai tercapai kadar gula konstan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pretreatment agent yang terbaik adalah NaOH dengan konsentrasi 5% dan untuk hidrolisa 0.1 ml enzim selulase/gram bagas + buffer dengan hasil akhir yield 14.046 gram glukosa/100 gram bagas awal dan konversi selulosa 79.738%.

Paper is not available

Karakterisasi Sifat-Sifat Fisikokimia Montmorilonit Sebelum Dan Setelah Diinterkalasi Besi Oksida

Serly Jolanda Sekewael¹⁾

1) Jurusan Kimia, Universitas Pattimura
Jl. Dr. Tamaela, Ambon, 97126, Indonesia
e-mail: sjsekewael@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan interkalasi besi oksida ke dalam antarlapis silikat lempung montmorilonit, dan dilanjutkan dengan karakterisasi sifat-sifat fisikokimia montmorilonit sebelum dan setelah diinterkalasi. Montmorilonit sebelum dan setelah diinterkalasi besi oksida dikarakterisasi untuk mempelajari perubahan sifat-sifat fisikokimianya yang meliputi: jarak dasar d_{001} , ditentukan dengan X-Rays Diffractometer; morfologi permukaan, dianalisis dengan SEM/EDAX; luas permukaan spesifik, distribusi ukuran pori, volume pori total, dipelajari dengan Gas Sorption Analyzer; serapan gugus fungsional, dipelajari dengan spektrofotometer FTIR; dan kandungan logam besi, ditentukan dengan X-Ray Fluorescent Analyzer. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan pada: jarak dasar d_{001} , dari 14,11Å menjadi 16,85Å; luas permukaan spesifik dari 69,71 m²/g menjadi 126,49 m²/g; volume pori total dari 50,70x10⁻³ mL/g menjadi 107,89x10⁻³ mL/g; serta peningkatan kandungan besi dari 4,57 %(b/b) menjadi 23,61 %(b/b). Morfologi permukaan montmorilonit menampilkan struktur berlapis (laminated), sedangkan montmorilonit hasil interkalasi besi oksida memperlihatkan morfologi lapisan oksida eksternal, dengan struktur delaminasi (delaminated).

Paper is not available

Konstruksi dan Ekspresi Mutan Delesi DNA Pol I ITB

S. Nurbaiti ¹⁾, S. Ekawardhani ¹⁾, L.R. Sihasale ²⁾ dan Akhmaloka ¹⁾

1) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: loka@chem.itb.ac.id

2) Jurusan Kimia/ Universitas Kristen Satya Wacana
Salatiga, Indonesia

Abstrak

Enzim DNA Polimerase berperan dalam menambahkan deoksinukleotida pada ujung pertumbuhan dari primer selama proses replikasi berlangsung. Enzim ini merupakan enzim multifungsi yang memiliki aktivitas polymerase 5'→3', eksonuklease 5'→3' dan eksonuklease 3'→5'. Gen DNA pol I dari bakteri termofilik isolat lokal telah diklon dan ditentukan urutan nukleotidanya. Konstruksi gen DNA pol mutan telah dilakukan dengan cara mutasi delesi in frame dengan menggunakan enzim restriksi. Dalam penelitian ini telah dilakukan konstruksi dan ekspresi DNA Polimerase mutan delesi (Δ)EcoRI, Δ XhoI dan delesi ganda Δ XhoI- Δ EcoRV. Ekspresi tinggi heterolog gen mutan delesi (Δ)EcoRI dan Δ XhoI telah dilakukan di E.coli strain GI724 sebagai protein fusi thioredoksin. Bobot molekul protein mutan hasil ekspresi tinggi telah dikonfirmasi dengan SDS-PAGE.

Kata kunci: DNA Polimerase, delesi in frame, mikroorganisme termofilik

1. Pendahuluan

Enzim yang dihasilkan dari mikroorganisme termofilik dikelompokkan sebagai enzim termostabil (termozim). Salah satu termozim yang sering digunakan dalam bidang biologi molekular adalah DNA Polimerase. Enzim dalam keluarga DNA Polimerase I terkarakterisasi dengan struktur multidomain yang menentukan adanya aktivitas polimerisasi, aktivitas eksonukleolitik 5'→3' dan aktivitas eksonukleolitik 3'→5' (Li, et.al., 1999). Setiap aktivitas terdapat pada domain yang secara struktural terpisah. Hans Klenow memperlihatkan bahwa enzim proteolitik seperti subtilin dapat memotong DNA Polimerase I menjadi dua fragmen, yaitu fragmen N-terminal kecil dan fragmen C-terminal besar. Fragmen C-terminal ini disebut sebagai fragmen Klenow yang terdiri atas domain polimerase dan eksonuklease 3'→5' (Kornberg, 2000). Seluruh struktur DNA Polimerase yang telah diteliti sejauh ini menunjukkan bahwa domain polimerase mempunyai struktur menyerupai tangan kanan tertutup sebagian dengan subdomain yang

disebut telapak, ibu jari dan jemari yang menyelubungi DNA seperti tangan kanan menggenggam silinder (Brautigam and Steitz, 1998).

DNA Polimerase termostabil komersial yang ada saat ini mempunyai kelebihan dan kekurangan terutama pada termostabilitas, laju polimerisasi, fidelitas, serta kemudahan hasil amplifikasi untuk diligasi. Aplikasi DNA Polimerase dalam berbagai bidang misalnya industri, kedokteran, forensik dan lain sebagainya, menyebabkan ekspolarasi sumber DNA Polimerase termostabil alternatif merupakan kajian yang menarik untuk diteliti.

Kelompok penelitian termofilik di ITB telah memiliki beberapa bakteri termofilik yang merupakan isolat dari beberapa kawah dan sumber air panas di Jawa Barat. Salah satunya adalah yang berasal dari sumber air panas Cimanggu, Jawa Barat, yang memiliki pH sekitar 5 dan temperatur berkisar 80°C. Gen pengkode DNA Polimerase dari isolat ini telah berhasil diisolasi dan ditentukan urutan nukleotidanya. Analisis homologi

menunjukkan menunjukkan bahwa gen DNA polimerase isolat tersebut memiliki homologi tertinggi (99%) dengan gen *pol A* (DNA Pol I) dari *Bacillus caldotenax*. Berdasarkan analisis urutan asam amino disarankan bahwa DNA Pol I hasil isolat lokal mempunyai 3 domain yang berperan dalam aktivitas katalitik yang berbeda, yaitu eksonuklease 5'→3', eksonuklease 3'→5' dan polimerase 5'→3' (Kiefer, 1992).

Analisis biokimia gen pengkode DNA Polimerase dari bakteri isolat lokal sedang dilakukan. Langkah awal analisis ini adalah dengan mempelajari letak domain-domain yang bertanggung jawab terhadap fungsi tertentu dengan melakukan mutasi di daerah-daerah tertentu. Kemudian mengekspresikan gen-gen mutan tersebut di *E.coli* GI724.

2. Percobaan

2.1 Penyiapan mutan delesi

Pembuatan mutan delesi dilakukan dengan memotong fragmen DNA dengan enzim restriksi yang sesuai. Fragmen DNA yang diperoleh disambung kembali dengan T4 DNA Ligase. Semua pengerjaan rekayasa genetika dilakukan dengan menggunakan metoda standar (Sambrook, *et.al.*, 1989).

2.2 Reaksi ligasi

Reaksi ligasi fragmen DNA mutan dengan vektor pTRxFus™ dilakukan sesuai prosedur yang direkomendasikan oleh produsen vektor dan enzim ligase (*Invitrogen*, USA; *Amersham*, USA) Reaksi ligasi dilakukan di dalam tabung *Eppendorf* 0,5 mL dengan mencampurkan 5 µL bufer ligasi 2x, 1µL vektor pTrxFus (50 ng/µL), 25-80 ng fragmen DNA hasil amplifikasi, 1µL T4 DNA ligase (3 unit/mL) dan aquabides bebas nuklease hingga 10 µL. Campuran dihomogenkan dengan pipet kemudian diinkubasi pada 4°C selama semalam.

2.3 Isolasi protein dari sel transforman

E.coli

Sel dipanen dengan cara sentrifugasi. Pelet sel yang telah diresuspensi dalam bufer lisis (50 mM Tris-Cl pH 8 ; 2,5 mM EDTA), kemudian dilisis dengan sonikasi selama 60 detik sebanyak 5-10 kali dengan interval waktu 30 detik. Selama proses sonikasi berlangsung , suspensi sel selalu diletakkan di dalam es. Debris sel berupa pelet dipisahkan dengan cara sentrifugasi 12.000 xg selama 10 menit, 4° C.

Supernatan yang diperoleh merupakan protein ekstrak kasar (*crude extract protein*) dan disimpan pada suhu – 20°C.

2.4 Elektroforesis Protein Gel

Poliakrilamida

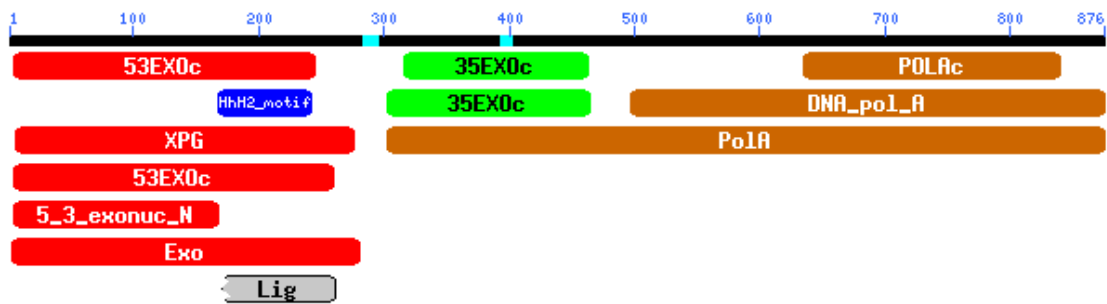
Elektroforesis gel poliakrilamida-natrium dodesil sulfat (SDS-PAGE) protein dilakukan dengan metode Sambrook (1989), yang penyiapan gel atas (*stacking gel*) dan gel bawah (*separating gel*) yang dimodifikasi. Gel atas 4% dibuat dari 1,33 mL akrilamida 30%; aquades 6,1 mL; 2,5 mL Tris-HCl 1M (pH 6,8); 100 µL SDS 10% (b/v); 50 µL amonumpersulfat 10% (b/v) dan 10 µL TEMED. Gel bawah 12,5% terbuat dari 4,0 mL akrilamida 30%; aquades 3,35 mL; 2,5 mL Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 100 µL SDS 10% (b/v); 50 µL amonumpersulfat 10% dan 5 µL TEMED. Pembuatan gel, dibekukan dengan menuangkan gel bawah ke dalam kaca-kaca alat elektroforesis yang sudah diset terlebih dahulu. Setelah gel bawah memadat, gel atas dituang diatas gel bawah dan dipasang "sisir" untuk cetakan sumur tempat sampel.

3. Hasil dan pembahasan

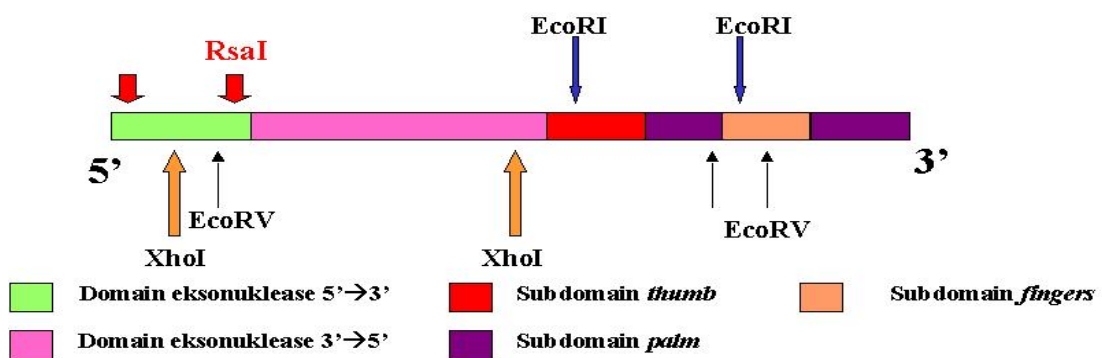
Dalam mempelajari struktur-fungsi suatu enzim diperlukan enzim *wild-type* maupun enzim-enzim mutannya dalam jumlah cukup banyak dan murni. Studi domain-domain yang penting bagi struktur enzim ataupun bagi suatu aktivitas memerlukan enzim mutan yang telah mengalami perubahan pada asam amino tertentu atau penghilangan satu atau lebih asam amino di daerah tertentu. Untuk memenuhi hal diatas, pada penelitian ini dilakukan konstruksi enzim-enzim DNA Polimerase mutan hasil mutasi delesi secara *in frame* dengan menggunakan enzim restriksi. Konstruksi gen DNA Polimerase mutan dilakukan dalam vektor ekspresi tinggi untuk kemudian diekspresikan secara heterolog di *E.coli* sehingga enzim mutan dapat diperoleh dalam jumlah besar. Hasil ekspresi heterolog ini dianalisa dengan elektroforesis SDS-PAGE. Produk gen hasil konstruksi merupakan protein fusi thioredoksin dengan DNA Polimerase.

3.1 Analisis Homologi DNA Polimerase

Analisis terhadap urutan basa gen DNA polimerase *wild type* mengindikasikan bahwa gen DNA polimerase WT dari bakteri isolate lokal mempunyai homologi tinggi (99%) dengan gen DNA polimerase I bakteri



Gambar 3.1 Hasil analisis homologi asam amino DNA Polimerase WT isolat lokal (www.ncbi.nlm.nih.gov)



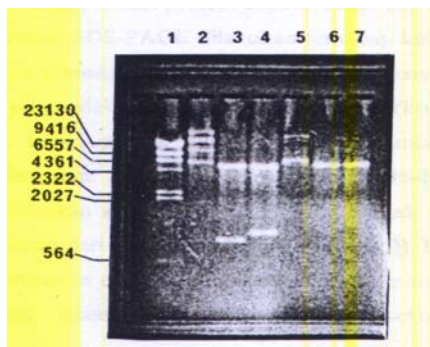
Gambar 3.2 Peta restriksi pada gen DNA polimerase WT

termofilik *Bacillus caldotenax*. Hal ini ditunjang dengan analisis urutan asam amino DNA Polimerase WT menggunakan CDD (*Conserved Domain Database*) *GenBank*. Hasil analisis menunjukkan bahwa struktur DNA Polimerase WT isolat lokal menunjukkan kesamaan dengan keluarga DNA Polimerase I. Kesamaan ini ditunjukkan dengan adanya domain POLAc (domain polimerase pada keluarga DNA Pol I), domain eksonuklease 5'→3' dan domain eksonuklease 3'→5'.

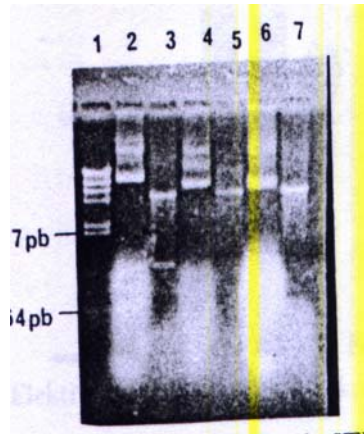
Berdasarkan data domain-domain DNA Polimerase I, dilakukan analisis restriksi secara *in silico* untuk kepentingan delesi secara *in frame* dengan mencari enzim restriksi yang memiliki 2 sisi pemotongan pada gen DNA polimerase WT. Dari sejumlah enzim yang ada dilakukan seleksi terhadap enzim restriksi yang memotong secara *in frame*. Peta restriksi berbagai enzim pada gen DNA pol WT ditampilkan pada gambar 4.2.

3.2 Konstruksi DNA Polimerase mutan delesi

Penelitian yang dilakukan telah menghasilkan tiga macam gen mutan delesi DNA Polimerase yaitu mutan $\Delta EcoRI$, mutan $\Delta XhoI$ dan mutan delesi ganda $\Delta XhoI-\Delta EcoRV$ di vektor ekspresi pTrxFusTM. DNA Pol mutan $\Delta EcoRI$ akan kehilangan 209 asam amino di daerah ujung C dan diduga kehilangan sebagian domain polimerase dan juga akan kehilangan salah satu aspartat yang lestari yaitu Asp⁶⁵³ sehingga mutan ini diduga akan memiliki aktivitas polimerase yang jauh lebih rendah dibandingkan enzim WT-nya. Proses delesi *in frame* dengan enzim *EcoRI* dilakukan pada pITB9 yaitu plasmid ekspresi pTrxFusTM yang membawa gen DNA polimerase WT. Hasil restriksi menunjukkan 2 pita DNA berukuran sekitar 5,6 Kb dan 627 pb pada elektroforesis agarosa. Fragmen 627 pb didelesi dari gen DNA polimerase WT dengan melakukan *self-ligation* fragmen 5,6 Kb. Hasil ligasi adalah plasmid pTrxFus-mutan $\Delta EcoRI$ (pITB11).



Gambar 3.3 . Elektroforegram karakterisasi plasmid pITB11. Marker DNA λ /HindIII (1); pITB9 yang tidak dipotong (2); pITB9/SalI (3); pITB9/PstI (4); pITB11 yang tidak dipotong (5); pITB11/SalI (6); pITB11/PstI (7)

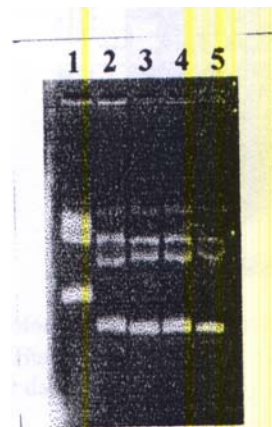


Gambar 3.4 . Elektroforegram karakterisasi plasmid pITB12. Marker DNA λ /HindIII (1); pITB9 yang tidak dipotong (2); pITB9/ XhoI (3); pITB12 yang tidak dipotong (4) ; pITB12/XhoI (5)

Delesi gen DNA polimerase WT dengan menggunakan enzim *XhoI* menyebabkan hilangnya 1116 pb. Enzim DNA Polimerase mutan $\Delta XhoI$ akan kehilangan 372 asam amino di daerah ujung N. Berdasarkan informasi yang diperoleh di CDD, DNA Polimerase mutan $\Delta xhoI$ akan kehilangan hampir seluruh domain eksonuklease 5'→3' dan eksonuklease 3'→5'. Proses delesi *in frame* mutan $\Delta XhoI$ dilakukan pada plasmid pITB9. Hasil restriksi pITB9 dengan enzim *XhoI* menunjukkan 2 pita DNA berukuran sekitar 5,1 Kb dan 1116 pb. Fragmen 1116 pb didelesi dengan melakukan *self-ligation* fragmen 5,1 Kb (pITB12).

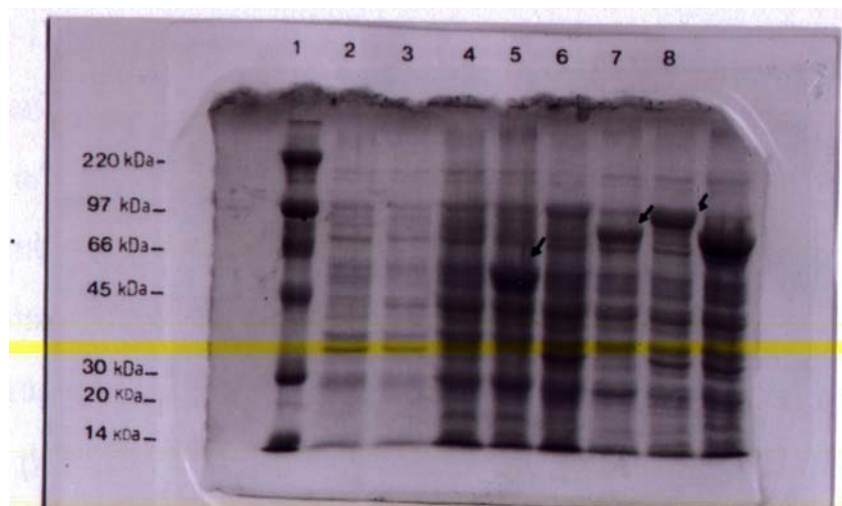
Berdasarkan hasil analisis restriksi secara *in silico*, enzim *EcoRV* memiliki tiga sisi pengenalan restriksi pada gen *pol I* WT. Sisi pemotongan pertama yaitu pada basa ke 468 dan terdapat pada daerah ujung 5' dari gen. Sisi pengenalan restriksi kedua dan ketiga terletak pada basa ke 2040 dan 2325 yang terletak pada daerah ujung 3' dari gen *pol I*. Daerah diantara sisi pemotongan kedua dan ketiga yang berukuran 285 pb yang akan didelesi pada gen. Gen *pol I* $\Delta EcoRV$ akan kehilangan 95 asam amino di daerah C-terminal yang diduga sebagai domain untuk aktivitas polimerase. Karena pada gen *pol I* terdapat tiga sisi restriksi *EcoRV* maka digunakan pITB12 (pTrxFus-*pol I* $\Delta XhoI$) yang hanya memiliki dua sisi pengenalan restriksi *EcoRV*. pITB12 mengandung insert gen *pol I* yang telah mengalami delesi fragmen *XhoI*. Restriksi sempurna pITB12 dengan enzim *EcoRV* akan

menghasilkan dua fragmen DNA yang berukuran sekitar 4,8 Kb dan 285 pb (data tidak ditampilkan). Delesi fragmen 285 pb dari gen *pol I* $\Delta XhoI$ dilakukan dengan meligasi kembali (*self-ligation*) fragmen 4,8 Kb. Hasil ligasi yang diperoleh digunakan untuk mentransformasi *E.coli* strain GI724 dengan tujuan menghasilkan klon yang membawa plasmid pTrxFus-*pol I* mutan ganda $\Delta XhoI$ - $\Delta EcoRV$.



Gambar 3.5. Elektroforegram plasmid pITB12 $\Delta EcoRV$. Plasmid pITB9 (1); pITB12 (2); pITB12 $\Delta EcoRV$ dari koloni 10, 21 dan 11 (lajur 3,4 dan 5)

3.3. Ekspresi DNA Polimerase Mutan Delesi
E.coli yang membawa plasmid pITB11 dan pITB12 ditumbuhkan dan diinduksi dengan menambahkan triptofan (konsentrasi akhir 100



Gambar 3.6. Elektroforegram SDS-PAGE protein ekstrak kasar dari koloni *E.coli* (GI724(pITB9)), (GI724(pITB11)) dan (GI724(pITB12)).

ug/mL) dengan tujuan enzim-enzim DNA Polimerase mutan dapat terekspresi. Adanya ekspresi tinggi ditandai dengan munculnya pita tebal pada elektroforegram SDS-PAGE.

4. Kesimpulan

Penelitian yang telah dilakukan telah menghasilkan 3 macam gen *pol I* mutan delesi dengan harapan mutan-mutan tersebut mewakili delesi enzim di daerah N-terminal, daerah C-terminal maupun dikeduanya. Gen *pol I* mutan $\Delta EcoRI$ dan $\Delta XhoI$ telah berhasil diekspresikan, sedangkan gen *pol I* mutan delesi ganda *XhoI-EcoRV* baru berhasil dikonstruksi dalam vektor ekspresi pTRxFus™.

5. Ucapan terima kasih

Penelitian ini tidak dapat terselenggara dengan baik tanpa bantuan dari Proyek Penelitian Riset Unggulan Terpadu (RUT).

6. Daftar Pustaka

Akhmaloka, Pramono, H., Suharto, A., Retnoningrum, D., Padmawinata, K., and Oei B.L. (2000), Cloning of DNA Polymerase Gene From Thermophilic Bacterium. 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK.

Amblar, M., de Lacoba, M.G., Corrales, M.A., López, P. (2001), Biochemical analysis of point mutations in the 5'-3' exonuclease of DNA Polymerase I of *Streptococcus pneumoniae*, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 19172-19181

Daniel, R. M., Dines, M., Petach, H. (1996), The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures, *Biochem.J.*, **317**, 1-11.

Joyce, C. M., Steitz, T. A. (1994), Function and structure relationship in DNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 777-822

Kiefer, J.R., Mao, C., Hansen, C.J., Basehore, S.L., Hogrefe, H.H., Braman J.C. (1997), Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution, *Structure*, **5**, 95-108.

Konberg, A. (1988), Minireview : DNA replication, *The Journal of Biological Chemistry*, **236**, 1-4.

Li, Y., Mitaxov, V., Waksman, G. (1999), Structure-based design of *Taq* DNA polimerase with improved properties of dideoxynucleotide incorporation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 9491-9496

Pramono, H. (2004), *Kloning dan ekspresi di E.coli gen DNA Polimerase I bakteri termofilik isolat Cimanggu*, Disertasi Doktor, Institut Teknologi Bandung

Sambrook, J., Fritsch, E.T., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring harbor, Lab. Press, NY.

Shima, Y., Hasegawa, A., Arakawa, T., Tanaka, K., Ikeda, K., Komatsubara, H., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., Emi, S., Yomo, T., Negoro, S., Urabe, I. (1996), Construction and characterization of N-terminally truncated DNA polymerase from *Thermus thermophilus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81**, 504-510.

Vieille, C., and Zeikus, G. J. (2001), Hyperthermophilic enzymes : sources, uses and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 1-43

The Effect Of *Garcinia Atroviridis* Extracts On Lipid Composition Of Normal

Satirah Zainalabidin¹⁾, Jalifah Latip²⁾, Engku Norbaya Muda¹⁾ and Paden Morat¹⁾

1) Dept. of Biomedical Science, Faculty of Allied Health Sciences, National University of Malaysia, Jalan Raja Muda Aziz, 50300 Kuala Lumpur.

e-mail: paden@medic.ukm.my

2) School of Chemical Sciences and Food Technology, National University of Malaysia, 43600 Bangi, Selangor.

e-mail: jali@pkrisc.ukm.my

Abstract

The effect of *Garcinia atroviridis* on lipid composition in the blood serum of normal rats was studied. The male Sprague-Dawley rats were used and divided into five groups, in which each group was treated with distilled water (control), *G. atroviridis* ethyl acetate (EtOAc) crude extract (50 & 100 mg/kg BW) and *G. atroviridis* ethanol (EtOH) crude extract (50 & 100 mg/kg BW) respectively. The extracts were given on alternate days, three times per week and through oral force-feeding. After 12 weeks of treatment, the serum of each rat was taken for total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride and total protein analyses using the spectrophotometric method. Overall, the result showed that the cholesterol, LDL, triglyceride, LDL/HDL ratio (atherogenic index) and total protein serum level were increased significantly ($p < 0.05$) in all of the treated groups, as compared to the control. In conclusion, EtOAc and EtOH crude extracts of *G. atroviridis* might not contain the bioactive compounds that can lower lipid levels in normal rats.

Keywords: *Garcinia atroviridis*, chronic treatment, lipid profile

1. Introduction

Garcinia atroviridis Griff ex T. Anders (Guttiferae) is a medium-sized tree and widely distributed throughout Peninsular Malaysia (Jena et al., 2002). The thinly sliced sun-dried fruits of *G. atroviridis* is locally known as *asam keping* and is available commercially as a seasoning in cooking (Ismail, 2000). In folkloric medicine, the fruits have been used as post-partum medications and for treating hypertension, cough, dandruff, earache and stomach pains associated with pregnancy (Burkill, 1966; Fui, 1992; Ismail, 2000; Permana et al., 2001).

Previous chemical studies have reported the isolation of garcinia acid and its ester derivatives from the fruits (Jena et al., 2002; Permana et al., 2001). Other isolated constituents are atroviridin (Kosin et al., 1998), atrovirinone, atrovirisidone and 4-methyl hydroatrovirinone were found from the dried

bark and root parts (Permana et al., 2001; 2003). Biologically, the crude methanolic extract from different parts of *G. atroviridis* were found to exhibit antibacterial, antioxidant, anti-tumor promoter and selective antifungal activities (Mackeen et al., 2000). Two new garcinia acid derivatives from the fruits showed antifungal activity against *Cladosporium herbarum* (Mackeen et al., 2002). In addition, the ethyl acetate (EtOAc) and ethanol (EtOH) crude extracts of the fruits were active against various bacterial and yeast strains (Basri et al., 2005).

Recently, there are slimming tablets in the market that contain *G. atroviridis* extract. Oral administration of (-)-HCA significantly reduced the rate of *in vivo* hepatic fatty acids and cholesterol synthesis, and there was a reduction in serum triglyceride and cholesterol levels in normolipidemic rats (Hamilton et al. 1977). Sources of (-)-HCA were reported from

the fruit rinds of *G. cambogia*, *G. indica* and *G. atroviridis*. This pilot study is an attempt to investigate whether the EtOAc and EtOH crude extracts of *G. atroviridis* have any hypolipidemic activity on normal rats.

2. Experimental

Plant Material

The dried fruits of *G. atroviridis* were collected at Kampung Air Kuning, Taiping, Malaysia and identified by National University of Malaysia Herbarium.

Extraction

The dried, ground fruits of *G. atroviridis* (1 kg) were extracted with Soxhlet apparatus for 24 hours, in solvent of different polarities namely petroleum-ether (pet-ether), EtOAc and EtOH. The three different aliquots were evaporated under reduced pressure (Buchi R200, Switzerland) to yield pet-ether, EtOAc and EtOH crude extracts. The EtOAc and EtOH crude extracts were given as chronic treatment to the rats.

Animals and treatment

Normal male Sprague-Dawley rats (250-300g) were used for the studies. They were housed in cages and maintained in a ventilated laboratory. The animals were handled according to the guidelines for care and use of laboratory animals rules by the the National University of Malaysia's Medical Animal Ethical Committee (FSKB/2003/PADEN/28-JULY/104). Two crude extracts, namely EtOAc and EtOH were given at the dose of 50 and 100 mg/kg BW to rats through oral-forced feeding for 12 weeks. The control rats were given distilled water.

Biochemical Analyses

Blood was collected from orbital sinus and also cardiac puncture at the end of the chronic treatment. After the blood had coagulated, it was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The serum was collected and stored at -20°C storage until analysis. Serum total cholesterol, HDL (High-Density Lipoprotein) and TG (triglyceride) were measured spectrophotometrically with commercial kits (Teco Diagnostics, CA). The LDL (Low-Density Lipoprotein) and atherogenic index were measured by formula. As for the the total protein, we referred to the Bradford's method (1976).

$$\text{LDL (mg/dl)} = \text{Total cholesterol (mg/dl)} - \text{HDL (mg/dl)} - \frac{\text{Triglyceride (mg/dl)}}{5}$$

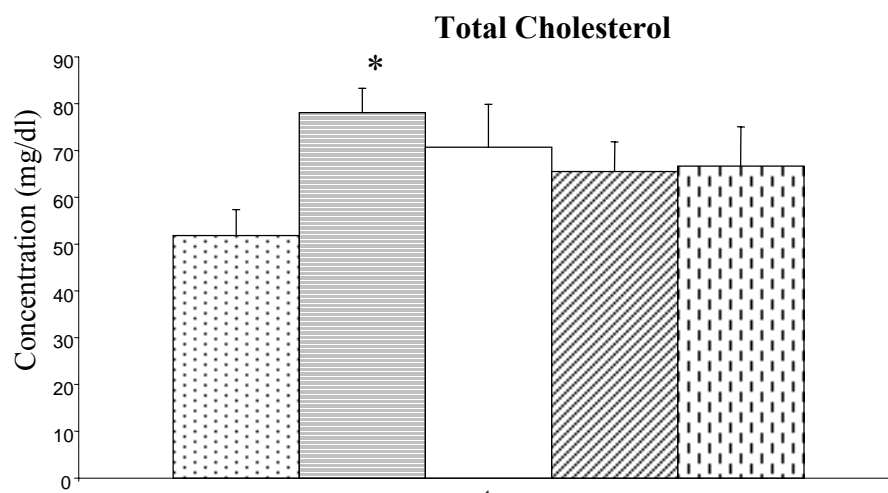
$$\text{Atherogenic Index} = \frac{\text{Total cholesterol (mg/dl)}}{\text{HDL (mg/dl)}}$$

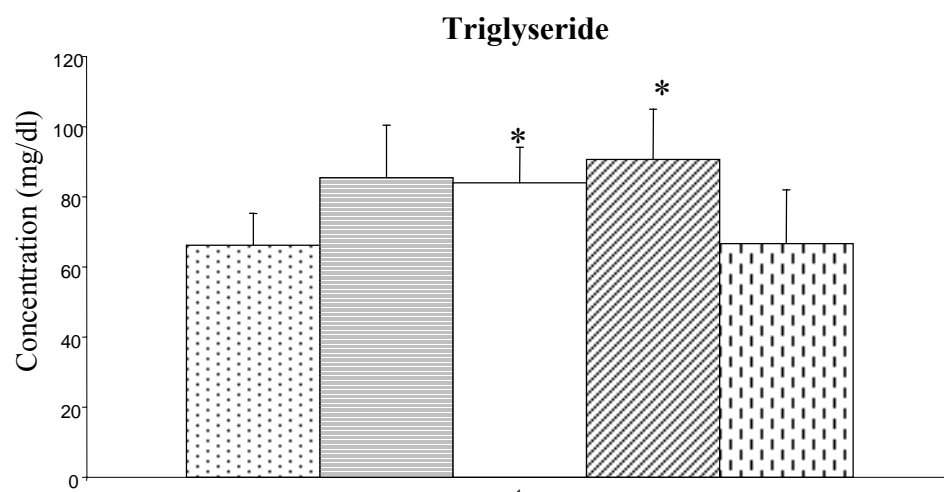
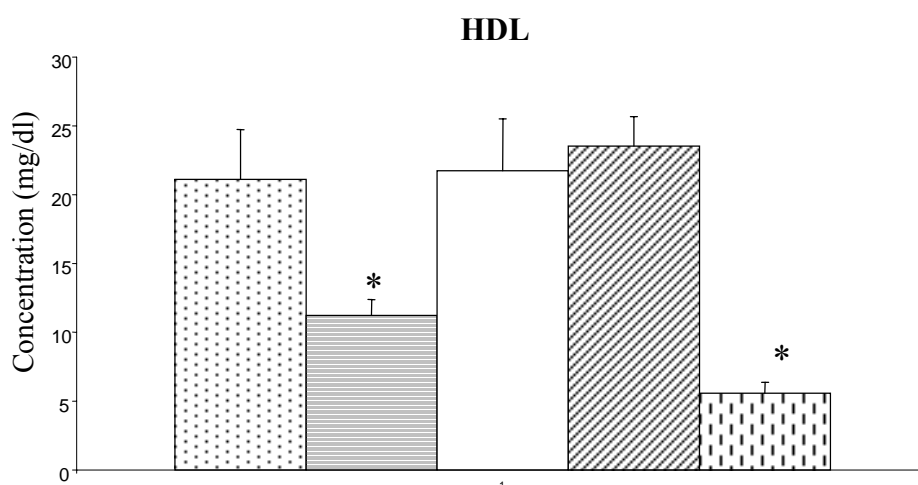
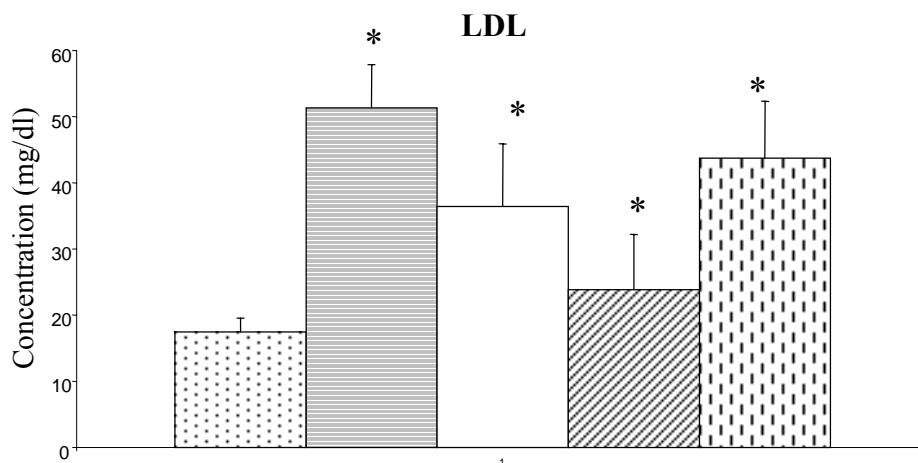
Statistical Analysis

Statistical significance was calculated using Student's t-test. Significance was accepted at $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

Overall, the results showed increments of total cholesterol, TG and LDL levels in the treated group rats compared to the normal rats. All of the treated groups showed increase in total cholesterol, but the group treated with EtOAc extract at dose 50 mg/kg BW increased significantly ($p < 0.05$) compared to the control rats. The HDL level was decreased significantly ($p < 0.05$) in EtOAc 50 mg/kg BW and EtOH 100 mg/kg BW. As for the total protein, there were no significant changes as compared to control rats. All groups, except for EtOH 50 mg/kg BW group, showed significant





increase in atherogenic index.

The treatment of EtOAc and EtOH extracts at the doses of 50 and 100 mg/kg BW did not show any hypolipidemic activity in normal rats. Contradictory, numerous extensive experimental studies have showed that hydroxycitric acid [(-)-HCA] which can be

found mainly in *G. cambogia*, followed by *G. indica* and *G. atroviridis*, inhibits fat synthesis and reduces food intake (Jena et al. 2002). Oral administration of (-)-HCA significantly reduced the rate of the *in vivo* hepatic fatty acids and cholesterol synthesis, and there was a reduction in serum TG and cholesterol levels in

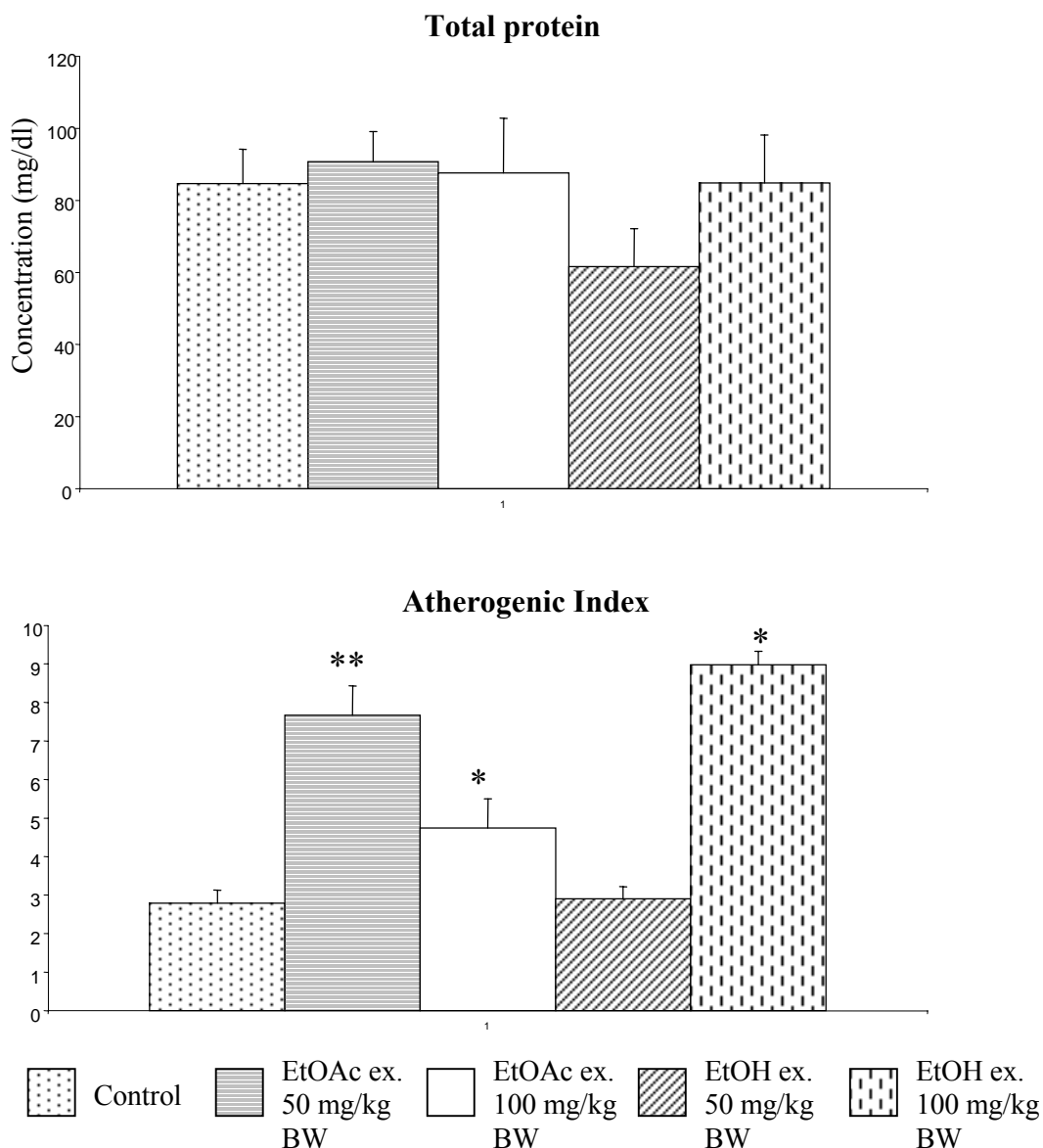


Fig. 1 Effect of chronic treatment of *G. atroviridis* on concentrations of total cholesterol, HDL, TG, LDL, total protein and atherogenic index in the serum of normal rats. Average of the values of 6 rats in each group \pm SEM * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

normolipidemic rats (Hamilton et al. 1977). Another study showed depression of the *in vivo* lipogenic rates in a dose-dependent manner in the liver, adipose tissue and small intestine and caused significant reductions in body-weight gain, food consumption and total body lipid (Sullivan et al. 1974a; 1974b). Administration of flavonoids from *G. cambogia* significantly lowered lipid levels in normocholesterolemic and hypercholesterolemic rats (Koshy et al. 2001).

All these studies encouraged exploration of the efficacy of (-)-HCA in the control of obesity and hypertriglyceridemia (Jena et al. 2002).

Maybe there are bioactive compounds such as (-)-HCA in the *G. atroviridis* fruit extract, but could not show any significant effects as they are still in mixture in the crude extracts. There could be other compounds that inhibit or counter-effect the HCA's activity in *G. atroviridis*. We cannot assume that *G. atroviridis* extracts do not contain the same bioactive compounds that lower cholesterol level like previous studies. Maybe direct consumption of *G. atroviridis* extract should not be encouraged for the purpose of lowering cholesterol level in our body.

4. Conclusions

Oral chronic treatment of EtOAc and EtOH *G. atroviridis* crude extracts did not alter the lipid compositions of normal rats significantly.

5. Acknowledgement

This work was supported by IRPA grant #09-02-02-0053EA149 from Ministry of Science And Technology, Malaysia.

6. References

- Basri D.F., Sharif R., Morat P., Latip J., (2005). Evaluation of antimicrobial activities of the crude extracts from *Garcinia atroviridis* and *Solanum torvum*, *Malaysian Journal of Science*, **24**, 233-238.
- Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Burkill I.H. (1966). A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula, Crown Agent, London.
- Fui L.H. (1992). Knowledge and Use of Forest Produce as Traditional Medicine: The Case of the Forest Dwelling Communities, Forest Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur.
- Ismail S. (2000). Sayuran Tradisional Ulam dan Penyedap Rasa. Publisher Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi.
- Hamilton J.G., Sullivan A.C., Kritchevsky D., (1977). Hypolipidemic activity of (-)-Hydroxycitric, *Lipids*, **12**, 1-9.
- Jena B.S., Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., (2002). Chemistry and Biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*, *Journal Agriculture Food Chemistry*, **50**, 1, 10-22.
- Kosin J., Ruangrunsi N., Ito C., Furukawa H., (1998). A Xanthone from *Garcinia atroviridis*, *Phytochem.*, **47**, 6, 1167-1168.
- Koshy A.S., Anila L., Vijayalakshmi N.R., (2001). Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats, *Food Chemistry*, **72**, 289-294.
- Mackeen M.M., Ali A.M., Lajis N.H., Kawazu K., Kikuzaki H., Nakatani N., (2002). Antifungal garcinia acid esters from the fruits of *Garcinia atroviridis*, *Z. Naturforsch.*, **57**, 3-4, 291-295.
- Mackeen M.M., Ali A.M., Lajis N.H., Kawazu K., Hassan Z., Amran M., Habsah M., Mooi L.Y., Mohamed S. M., (2000). Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant extracts of *Garcinia atroviridis* Griff ex T. Anders, *J Ethnopharmacol*, **72**, 395-402.
- Permana D., Lajis N.H., Khozirah S., Mackeen M.M., Ali A.M., Aimi N., Kitajima M., Takayama H., (2003). A new prenylated hydroquinone from the roots of *Garcinia atroviridis* Griff ex T. Anders (Guttiferae), *Z. Naturforsch*, **58b**, 332-335.
- Permana D., Lajis N.H., Mackeen M.M., Ali A.M., Aimi N., Kitajima M., Takayama H., (2001). Isolation and bioactivities of constituents of the roots of *Garcinia atroviridis*, *J Nat Prod.*, **64**, 7, 976-979.
- Sullivan A.C., Triscari J., Hamilton J.G., Miller O.N., Wheatley V.R., (1974a). Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in rat. (I) lipogenesis, *Lipids*, **9**, 121-128.
- Sullivan A.C., Triscari J., Hamilton J.G., Miller O.N., Wheatley V.R., (1974b). Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in rat (II) Appetite, *Lipids*, **9**, 129-134.

Pemanfaatan Biji Kelor (*Moringa Oleifera*) Sebagai Koagulan Pada Proses Koagulasi/Flokulasi Dan Sedimentasi Limbah Cair Industri Pencucian Jeans

Setiaty Pandia dan Khairul Amdani

Program Studi Magister Teknik Kimia, Program Pascasarjana USU
Jl. Sivities Akademika Kampus USU, Medan 20155, Tel. (061)8212453
Email: setiaty_pandia@yahoo.com

Abstrak

Kelor (Moringa oleifera) termasuk famili Moringaceae, merupakan suatu genus tunggal dari famili pohon semak belukar yang dibudidayakan diseluruh daerah tropis dan dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui; kemampuan koagulan biji kelor dalam menurunkan turbiditas limbah cair industri pencucian jeans pada proses koagulasi/flokulasi, dosis optimum koagulan pada proses tersebut, pengaruh waktu sedimentasi dan kedalaman kolom sedimentasi terhadap turbiditas tersisihkan pada proses sedimentasi limbah cair industri pencucian jeans yang dikoagulasi/flokulasi dengan koagulan biji kelor. Penggunaan koagulan biji kelor berpengaruh sangat nyata terhadap turbiditas tersisihkan limbah cair dengan pH optimum koagulasi 3 (tiga) dan turbiditas tersisihkan 83,08%. Turbiditas limbah cair industri pencucian jeans juga dipengaruhi oleh dosis koagulan biji kelor. Dosis optimum koagulan adalah 120 mg/250 mL atau 480 mg/L dengan turbiditas tersisihkan 92,21%. Untuk ketiga kedalaman titik uji (30 cm, 90 cm dan 150 cm) dan waktu sedimentasi 150 menit dijumpai bahwa peningkatan waktu sedimentasi dari sampel yang dikoagulasi/flokulasi dengan biji kelor akan meningkatkan turbiditas tersisihkan. Keadaan sebaliknya berlaku pada kedalaman kolom, dimana peningkatan kedalaman kolom akan menurunkan turbiditas tersisihkan untuk waktu sedimentasi yang sama.

Kata kunci: biji kelor, limbah cair pencucian jeans, pH.

1. Pendahuluan

Salah satu kebutuhan pokok manusia adalah kebutuhan akan pakaian. Di Indonesia, industri tekstil sebagai penghasil pakaian telah dibangun dalam jumlah yang relative banyak. Dan salah satu dari industri tekstil itu adalah industri pencucian jeans (*denim*). Industri pencucian jeans merupakan industri penyempurnaan basah (melalui proses pencucian/peluruhan) pakaian jadi jeans untuk meningkatkan kelemasan (*softness*) dan untuk mendapatkan kenampakan yang diinginkan (*desired look*) dari produk pakaian jadi jeans tersebut.

Sebagaimana lazimnya kebanyakan industri, industri pencucian jeans juga memiliki limbah cair yang perlu terlebih dahulu diolah sebelum dibuang ke badan air penerima agar tidak mencemari lingkungan. Limbah cair industri

pencucian jeans umumnya mempunyai pH, COD, BOD dan padatan tersuspensi melebihi nilai ambang batas baku mutu air limbah industri yang ditetapkan. Biasanya dalam pengolahan secara fisika-kimia limbah cair industri pencucian jeans digunakan bahan koagulan seperti alum (tawas), ferrosulfat atau PAC (*polyaluminium chloride*) saat proses koagulasi.

Koagulasi/flokulasi diperlukan untuk menghilangkan material limbah berbentuk suspensi atau koloid. Umumnya partikel-partikel tersuspensi/koloid dalam air buangan memperlihatkan gerak Brownian. Permukaan partikel-partikel tersebut bermuatan listrik negatif. Ion-ion atau koloid bermuatan positif (kation) yang ditambahkan untuk meniadakan kestabilan partikel koloid tersebut di atas dapat dihasilkan dari senyawa organik atau anorganik

tertentu yang disebut koagulan.

Setelah partikel-partikel koloid mengalami destabilisasi, adalah penting untuk membawa partikel-partikel tersebut ke dalam suatu kontak antara satu dengan yang lainnya sehingga dapat menggumpal dan membentuk partikel yang lebih besar yang disebut flok. Salah satu cara penghilangan flok adalah melalui sedimentasi. Sedimentasi adalah suatu proses penghilangan padatan tersuspensi (*suspended solid*) dari air atau limbah cair berdasarkan perbedaan spesifik gravitasi (*specific gravity*).

Kelor (*Moringa oleifera*) termasuk famili *Moringaceae*, merupakan suatu genus tunggal dari famili pohon semak belukar yang dibudidayakan di seluruh daerah tropis dan dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan (Jahn dalam Muyibi dan Evison, 1995). Menurut Ndabigengesere (Chandra, 1998), biji kelor mengandung suatu zat aktif (*active agent*) 4 α -4-rhamnosyloxy-benzyl-isothiocyanate sebagai protein kationik. Zat aktif ini dapat membantu menurunkan gaya tolak-menolak antara partikel koloid dalam air, sehingga dapat digunakan sebagai bahan koagulan dalam proses pengolahan air. Dalam proses koagulasinya, biji kelor memberikan pengaruh kecil terhadap derajat keasaman dan konduktifitas. Jumlah lumpur yang diproduksi biji kelor lebih sedikit dari jumlah lumpur yang diproduksi oleh ferro sulfat sebagai

Tabel 1. Karakteristik Pencemaran Gabungan Air Limbah dari Semua Proses Industri Pencucian Jeans.

Parameter	Kadar
pH	8 – 10,5
COD	300 – 1500 mg/l
BOD	80 – 350 mg/l
Padatan tersuspensi	100 – 400 mg/l
Minyak/Lemak	0 – 34,3 mg/l
Warna	Keruh kebiruan

koagulan.

Biji kelor mengandung sejenis protein yang larut dalam air (*water-soluble protein*) berbobot molekul rendah. Apabila dilarutkan, biji kelor menghasilkan muatan-muatan positif dalam jumlah yang banyak. Larutan biji kelor tersebut bereaksi sebagai koagulan polimer alamiah bermuatan positif (Sutherland *et al*, 1994). Namun, biji kering dengan kulit lebih efektif dari biji tanpa kulit. Hal ini diduga karena biji dengan kulit mengandung lebih banyak protein kationik dari pada biji tanpa kulit (Chandra, 1998).

Pencemar yang utama dari industri pencucian jeans adalah limbah cair. Limbah cair dari setiap proses mengandung sisa bahan kimia yang digunakan dan bahan yang dikeluarkan dari serat seperti kanji dan zat warna. Karakteristik pencemaran gabungan air limbah

Tabel 2. Hasil Percobaan Pengaruh pH Koagulasi terhadap Turbiditas Limbah Cair Industri Pencucian Jeans dengan Menggunakan Koagulan Biji Kelor dan Hasil Uji Jarak Duncan (UJD) Turbiditas Tersisihkan dalam Bagan huruf.

No	pH	Turbiditas		Hasil UJD dalam Bagan Huruf
		Akhir (FTU)	Tersisihkan (%)	
1	2	126,33	80,80	ab AB
2	3	111,33	83,08	aA
3	4	141,17	78,47	bB
4	5	185,67	71,78	cC
5	6	198,33	69,86	cd CD
6	7	212,67	67,68	d DE
7	8	233,00	64,59	e EF
8	9	248,00	62,31	e FG
9	10	272,33	58,61	f GH
10	11	294,00	55,32	gH

Keterangan:

1. UJD= Ujia Jarak Duncan
2. Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang tidak sama berarti berbeda nyata pada taraf 5% (huruf kecil) dan berbeda sangat nyata pada taraf 1% (huruf besar).

dari semua prosesnya ditunjukkan pada Tabel 1.

2. Percobaan

Untuk membuat koagulan biji kelor, buah kelor yang sudah matang (berwarna coklat) dan kering secara alamiah di pohonnya diambil lalu bijinya dikeluarkan dari dalam buah. Biji dengan cangkangnya yang bersih kemudian diblender hingga menjadi bubuk dan diayak dengan ayakan tepung, lalu dikeringkan dalam oven pemanas pada suhu 120°C selama 30 menit untuk menghomogenkan kadar airnya. Tepung biji kelor tersebut kemudian dicampur aquadest (5 gram tepung biji kelor dalam 100 ml aquadest). Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai koagulan.

Dengan menggunakan sampel limbah cair sebanyak 30 liter, diamati variable pH, dosis koagulan dan turbiditas pada proses koagulasi/flokulasi serta variabel waktu dan turbiditas pada proses sedimentasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil percobaan pengaruh pH koagulasi terhadap turbiditas limbah cair industri pencucian jeans pada proses koagulasi/flokulasi untuk menentukan pH koagulasi optimum yang diperoleh disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 1. Dalam hal ini, untuk koagulan biji kelor, yang disajikan merupakan hasil rata-rata dari 3 (tiga) kali ulangan percobaan sedangkan untuk koagulan tawas, yang disajikan merupakan

hasil dari 1 (satu) kali ulangan percobaan.

Berdasarkan hal diatas, terlihat bahwa pH optimum koagulasi untuk koagulan biji kelor terjadi pada pH 3.

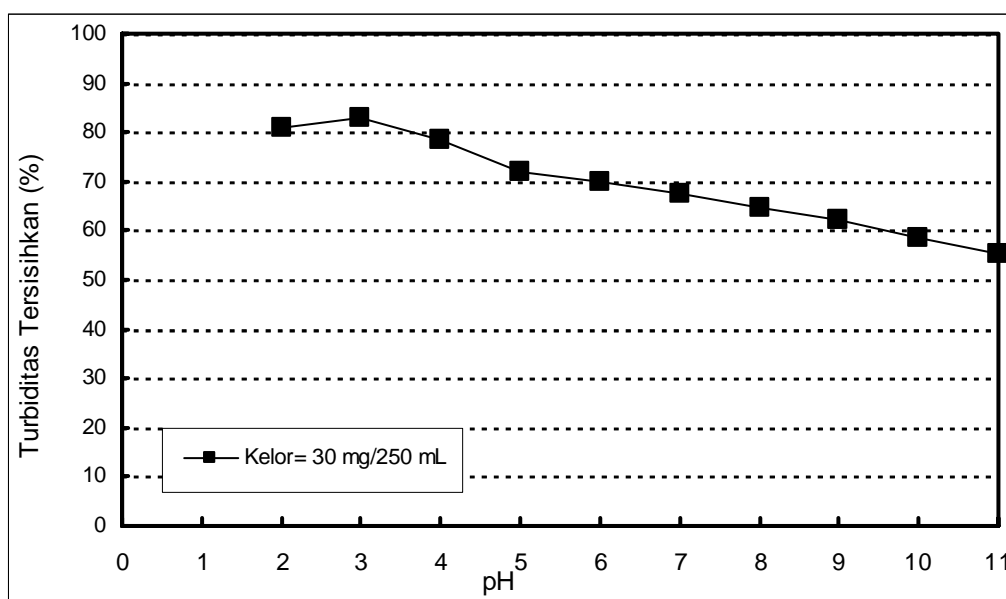
Hasil percobaan pengaruh dosis koagulan terhadap turbiditas limbah cair industri pencucian jeans disajikan dalam Gambar 2.

Selanjutnya berdasarkan hasil Uji Jarak Duncan sebagaimana disajikan pada Tabel 3 terlihat bahwa dosis koagulan 120 mg/250 mL memberikan kualitas terbaik dibandingkan dengan dosis lainnya.

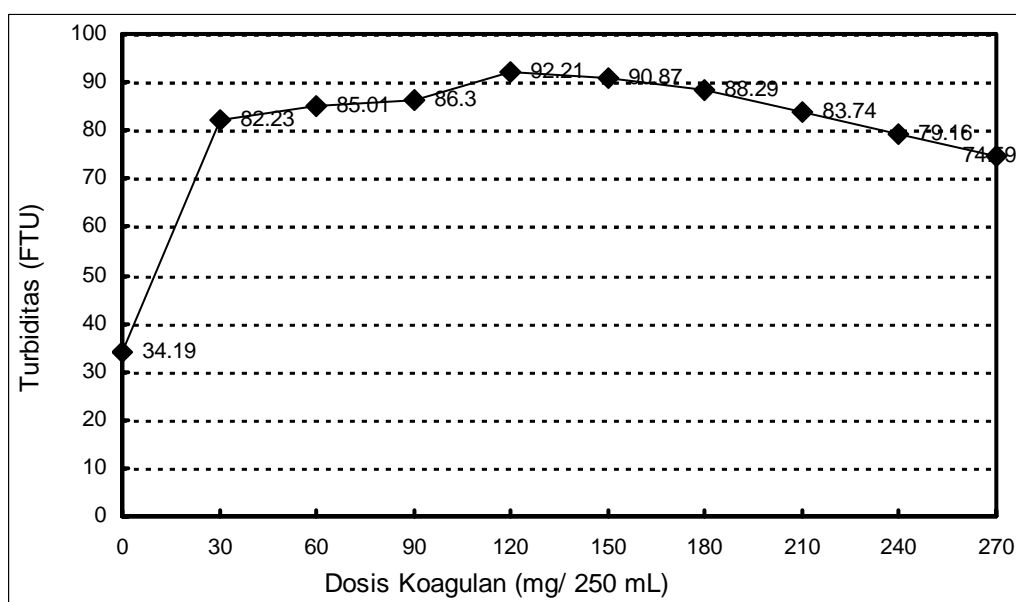
Keasaman (pH) optimum koagulasi dan dosis optimum koagulan ini kemudian digunakan untuk melihat pengaruh waktu sedimentasi terhadap turbiditas tersisihkan limbah cair. Untuk koagulan tawas (sebagai pembanding), pH optimum adalah 6 dan dosis koagulan optimumnya adalah 60 mg/250 mL.

Dengan menggunakan kolom sedimentasi dengan ukuran panjang 220 cm dan diameter penampang 5 inci, dipelajari profil pengendapan limbah yang telah dikoagulasi/diflokulasi pada pH dan dosis koagulan optimum.

Gambar 3 merupakan grafik profil pengendapan limbah cair industri pencucian jeans yang dikoagulasi/ diflokulasi dengan koagulan biji kelor.



Gambar 1. Hubungan Persen Turbiditas Tersisihkan dengan pH Koagulasi pada Proses Koagulasi/Flokulasi



Gambar 2. Hubungan Persen Turbiditas Tersisihkan dengan Dosis Koagulan Kelor pada Proses Koagulasi/Flokulasi, pH koagulasi=3

Tabel 3. hasil Percobaan Pengaruh Dosis Koagulan terhadap Turbiditas Limbah Cair Industri Pencucian Jeans dengan Menggunakan Koagulan Biji Kelor dan hasil Uji arak Duncan (UJD) Turbiditas Tersisihkan dalam Bagan Huruf

No	Dosis Koagulan (mg/mL)	Turbiditas		Hasil UJD dalam Bagan Huruf
		Akhir (FTU)	Tersisihkan (%)	
1	0	307,33	34,19	fF
2	30	83,00	82,23	cdBCD
3	60	70,00	85,01	bcdABC
4	90	64,00	86,30	abcABC
5	120	36,39	92,21	aA
6	150	42,64	90,87	abAB
7	180	54,69	88,29	abcABC
8	210	75,93	83,74	cdABC
9	240	97,33	79,16	deCD
10	270	118,67	74,59	eE

4. Kesimpulan

Hasil percobaan pengaruh pH koagulasi terhadap turbiditas limbah cair industri pencucian jeans pada proses koagulasi/flokulasi menunjukkan bahwa pada penggunaan koagulan biji kelor, pH koagulasi berpengaruh sangat nyata terhadap turbiditas tersisihkan limbah cair industri pencucian jeans. Derajat Keasaman (pH) optimum koagulasinya adalah 3 (tiga) dengan turbiditas tersisihkan 83,08%.

Hasil percobaan pengaruh dosis koagulan terhadap turbiditas limbah cair industri pencucian jeans pada proses koagulasi/flokulasi menunjukkan bahwa dosis koagulan biji kelor

berpengaruh sangat nyata terhadap turbiditas tersisihkan limbah cair industri pencucian jeans. Dosis optimumnya adalah 120 mg/250 mL atau 480 mg/L dengan turbiditas tersisihkan 92,21%. Semakin lama waktu sedimentasi dari sampel yang dikoagulasi/flokulasi dengan biji kelor, semakin besar turbiditas tersisihkan, dan semakin besar kedalaman kolom, semakin kecil turbiditas tersisihkan untuk waktu sedimentasi yang sama.

5. Daftar Pustaka

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Tekstil (1991). Buku Panduan Pengendalian Pencemaran Pada Industri Kecil

Setiaty Pandia dan Khairul Amdani

Pencucian/Peluruhan Pakaian Jadi Jeans. Proyek Pengembangan Sumber Daya, Energi dan Pengendalian Pencemaran Industri. Bandung.

Chandra A. (1998). *Penentuan Dosis Optimum Koagulan Ferro Sulfat-Kapur, Flokulan Chemifloc dan Besfloc serta Biofloculan Moringa Oleifera dalam Pengolahan Limbah Cair Pabrik Tekstil*. Tesis Magister. Jurusan Teknik Kimia Universitas Parahyangan. Bandung.

Muyibi A.S., Evison L.M., (1995). Moringa oleifera seeds for softening Hardwater. *Wat Res.* **29**(4), 1099-1105.

Sutherland J.P., Folkard G.K., Mtawali M.A., Grant W.D., (1994). Moringa oleifera as a Natural coagulant. *20th WEDC Conference, Affordable Water Supply and Sanitation*, Colombo, Srilangka, 122-127.

Karakterisasi Enzim α -Amilase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Termofil SW2

Siswati Setiasih¹⁾, Budiasih Wahyuntari²⁾, Trismilah³⁾, dan Dewi Apriliani¹⁾

1) Dept Kimia FMIPA Universitas Indonesia
Kampus Baru Depok Jawa Barat
e-mile : Setiasih@makara.cso.ui.ac.id

2) Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi, BPPT
PUSPITEK, Serpong, Tangerang Banten
e-mile : budiasih_solichin@yahoo.com

3) Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi, BPPT
PUSPITEK, Serpong, Tangerang Banten
e-mile : Trismilah_m@yahoo.com.id

Abstrak

Dalam penelitian ini digunakan isolate bakteri termofil SW2, dari Pusat Pengolahan Kompos, sebagai sumber enzim α -amilase ekstraseluler. Isolasi enzim dilakukan setelah bakteri tersebut diaktifkan dan dikultur dalam medium yang mengandung pati kentang pada suhu 60°C, pH 7,5 selama 39 jam. Enzim α -amilase ekstraseluler yang diperoleh memiliki aktivitas optimum pada suhu 70°C, dan pH 6,0. Enzim ini merupakan α -amilase logam karena aktivitas katalitiknya dapat ditingkatkan oleh ion logam, seperti Na^+ , K^+ , Mn^+ dan Ca^{2+} serta diinhibisi sangat kuat oleh Zn^{2+} , Fe^{2+} dan EDTA. Aktivitas enzim ini juga diturunkan oleh adanya senyawa SDS dan urea. Sedangkan efek penyimpanan selama 4 bulan pada suhu kamar dapat menurunkan aktivitas enzim hingga mencapai $\pm 50\%$. Berat molekul enzim kasar ditentukan dengan metode elektroforesis SDS-poliakrilamid dan diperoleh sekitar 180 kDa.

Kata kunci : α -Amilase, karakterisasi, SW2, , termofil

1. Pendahuluan

Berbagai jenis isolat mikroorganisme telah didapatkan dan diketahui memiliki peranan yang besar sebagai penghasil enzim yang berguna dalam industri. Enzim digunakan dalam industri karena bersifat sangat spesifik dibandingkan dengan katalis inorganik. Selain itu, enzim bekerja sangat efisien, beroperasi pada kondisi lunak, aman dan mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, dan dapat didegradasi secara biologis (Lin *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1995)

Enzim mempunyai nilai ekonomi tinggi. Dalam industri pangan, enzim α -amilase berfungsi menyediakan gula hidrolisis pati sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi sirup glukosa ataupun sirup fruktosa yang mempunyai tingkat kemanisan tinggi, pembuatan roti, dan makanan bayi. Di industri

tekstil enzim α -amilase digunakan untuk membantu dalam proses penghilangan pati, yang digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat ditenun agar lentur, proses ini memerlukan temperatur sekitar 70-80°C. Mikroorganisme termofilik dapat menghasilkan enzim yang tahan terhadap temperatur tinggi. Kelebihan pada proses industri yang menggunakan temperatur tinggi antara lain dapat meningkatkan laju reaksi kimia termasuk reaksi enzimatik, efisien, dan dapat mengurangi kontaminasi (Viele., 2001; Trismillah., 2000; Lin *et al.*, 1998)

Enzim α -amilase adalah enzim ekstraseluler yang mengkatalisis reaksi pemotongan ikatan glukosidik $\alpha \rightarrow 1,4$ pada bagian dalam molekul substrat (endoenzim). Secara komersial enzim ini dihasilkan baik oleh bakteri seperti dari genus *Bacillus*, maupun kapang dari genus

Aspergillus dan *Rhizopus* (Shaw., 1995; Dyah., 1995)

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya, yang bertujuan memproduksi enzim α -amilase ekstraseluler. Sebagai sumber enzim digunakan bakteri termofil *Bacillus* SW2 yang diisolasi dari Pusat Pengolahan Kompos, BSD-Tangerang. Enzim hasil isolasi tersebut selanjutnya akan digunakan dalam industri tekstil. Alasan utama dari pemanfaatan mikroorganisme adalah untuk menghemat biaya impor enzim tersebut. Sel mikroorganisme merupakan sumber penghasil enzim yang sangat potensial karena untuk peningkatan produksi enzim dapat dilakukan dengan lebih mudah, misalnya dengan cara pengaturan kondisi lingkungan pertumbuhannya. Fokus pekerjaan dari penelitian ini adalah pada uji karakterisasi enzim kasar hasil pemekatan melalui ultrafiltrasi. Uji aktivitas enzim dilakukan terhadap berbagai pengaruh lingkungan seperti: suhu, pH, aktivator serta inhibitor enzim. Untuk penentuan berat molekul protein enzim digunakan SDS-PAGE.

2. Percobaan

2.1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofil SW2 bersifat gram positif berbentuk batang, koloni bulat tidak beraturan berwarna krem, tebal dan tidak tembus pandang. Bakteri tersebut diisolasi dari pusat pengolahan kompos BSD, Tangerang, dan biakannya dipelihara serta diperbanyak pada medium agar.

2.2. Media

Komposisi media agar yang digunakan adalah maizena 2%, agar teknis 1,65%, gum gellan "Gelrite" 0,35%, ekstrak ragi 0,5%, bacto pepton 0,5%, K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1%. Komposisi media fermentasi terdiri atas, pati kentang 1%, ekstrak ragi 0,5%, bacto pepton 0,5%, K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1%

2.3. Fermentasi

Inokulum yang telah disiapkan dimasukkan secara aseptik ke dalam media fermentasi (90% volume produksi), lalu diinkubasi selama 39 jam pada suhu 60°C di dalam *shaker incubator* yang berkecepatan 150 rpm. Cairan fermentasi (*broth*) yang mengandung α -amilase

ekstraseluler dipisahkan dari selnya dengan cara disentrifus pada kecepatan 4000 rpm, 4°C selama 30 menit. Filtrat enzim yang didapat kemudian dipekatkan 10 kali dengan ultrafiltrasi menggunakan membran pemisah berukuran 30 kilodalton (Kda).

2.4. Penentuan aktivitas enzim

Penentuan aktivitas ini berdasarkan pada penguraian substrat oleh enzim. Aktivitas α -amilase ditentukan dengan metode kolorimetri Fuwa (Taji., 1988; Wiseman., 1979). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan penurunan warna sebesar 50% pada kondisi di atas.

2.5. Penentuan kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford), dan sebagai standar protein digunakan larutan bovine serum albumin ((Kruger., 1994; Bradford., 1976)

2.6. Pengaruh temperatur dan pH

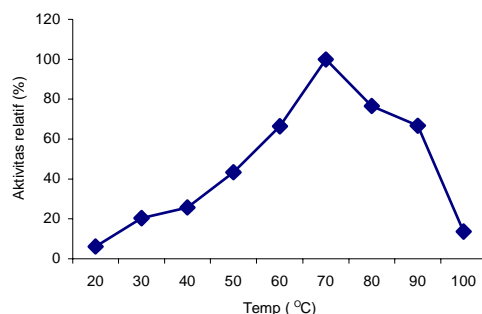
Kondisi optimum bagi aktivitas enzim α -amilase ditentukan dengan cara memvariasikan temperatur (yaitu : 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100°C) dan memvariasikan pH pada temperatur optimumnya (yaitu : pH 4,0; 5,0; 6,0 menggunakan buffer sitrat 20 mM; pH 6,0; 7,0; 8,0 menggunakan buffer fosfat 20 mM; dan pH 9,0; 10,0 menggunakan buffer glisin-NaOH). Stabilitas penyimpanan α -amilase ditentukan dengan cara menyimpan filtrat enzim pada suhu kamar (30°C) dan suhu dingin (4°C). Kemudian secara berkala dilakukan pengujian aktivitas enzimnya, selama 4 bulan penyimpanan yang diukur pada temperatur dan pH optimum enzim.

2.7. Pengaruh berbagai ion logam dan agen-agen pendenaturasi

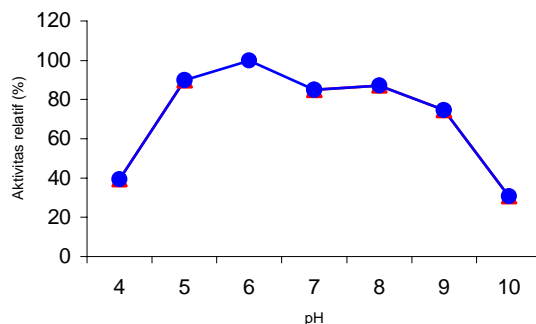
Filtrat yang mengandung enzim diinkubasi dengan berbagai senyawa ion logam (KCl, LiCl, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $ZnCl_2$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$) masing-masing pada konsentrasi 1 mM, 5 mM, dan 10 mM selama 30 menit. Sedangkan pengaruh agen-agen pendenaturasi protein dilakukan dengan cara menginkubasi filtrat enzim dengan senyawa SDS (konsentrasi 0,4%, 1,0% dan 1,5%), EDTA dan urea (konsentrasi 1 mM, 5 mM dan 10 mM) selama 30 menit. Aktivitas α -amilase diukur pada temperatur dan pH optimum yang diperoleh pada percobaan sebelumnya..

Tabel 1. Tahap pemekatan α -amilase ekstraseluler SW2

	Volum (mL)	Aktivitas Rata ² (unit)	Total (unit)	Protein Rata ² (mg/mL)	Total (mg)	Aktivitas Spesifik (unit/mg protein)	Tingkat Kemurnian
Broth	2000	1,300	2600	1,293	2585,9	1,005	1
Supernatan (sentrifus)	1900	1,116	2120,4	0,027	51,775	40,954	41
Supernatan (ultrafiltrasi)	200	4,636	927,2	0,093	18,69	49,609	50
Filtrat (ultrafiltrasi)	1700	0	0	0,0078	13,175	0	0



Gambar.1 Pengaruh temperatur terhadap aktivitas α -amilase ekstraseluler SW2



Gambar.2 Pengaruh pH terhadap aktivitas α -amilase ekstraseluler SW2

2.8. Penentuan bobot molekul enzim kasar

Enzim hasil isolasi ditentukan bobot molekulnya secara elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid sodium dodosil sulfat 7,5% (SDS/PAGE) Zimogram dengan standar marker *High Molecular Weight* (HMW-SDS)(Amershem Pharmacia Biotech, Uppsala, sweden) Gel hasil elektroforesis diinkubasi dalam larutan amilum dan pita-pita pteprotein yang terpisah diwarnai dengan

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Shaw., 1995; Boyer., 1993)

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Produksi Enzim

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, kondisi optimum proses fermentasi dilakukan pada suhu 60°C, pH awal 7,5 selama 39 jam di dalam *shaker incubator* yang berkecepatan 150 rpm (Widyasti., 2002). Cairan fermentasi yang diperoleh dipisahkan dari selnya dengan

cara sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm, 4°C selama 30 menit, kemudian dipekatkan 10 kali dengan ultrafiltrasi. Pemekatan dengan ultrafiltrasi berdasarkan pada kemampuan membran dengan tekanan hidrostatis tinggi untuk menahan komponen yang mempunyai ukuran partikel yang relatif besar serta melewati pelarut dan zat terlarut dengan ukuran partikel yang lebih kecil, sehingga didapatkan filtrat enzim yang lebih murni (Copeland., 1994). Pemekatan juga bertujuan agar enzim lebih stabil selama masa penyimpanan. Hasil penentuan aktivitas enzim α -amilase ekstraseluler yang terdapat dalam supernatan dapat dilihat pada Tabel 1.

Pemekatan enzim dengan ultrafiltrasi menyebabkan tingkat kemurnian naik sebesar 50 kali dibandingkan *broth*, kenaikan ini disebabkan karena molekul air dan juga protein lain yang ukurannya lebih kecil dari 30 kDa dapat terlewatkan sehingga memberikan kenaikan aktivitas spesifik.

3.2. Karakterisasi

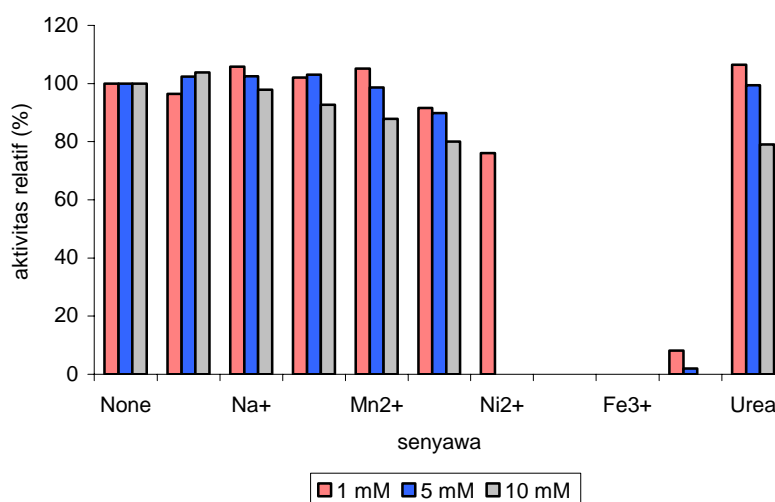
Temperatur optimum bagi aktivitas α -amilase yang diperoleh dari hasil percobaan yaitu 70°C. Di bawah temperatur optimum (60°C) dan di atas temperatur optimum (90°C), enzim masih memiliki aktivitas sebesar $\pm 66\%$. Ada 80°C enzim masih memiliki aktivitas sebesar $\pm 77\%$ dibandingkan aktivitas pada temperatur optimumnya (Gambar 1). Hasil penelitian lain

menyatakan bahwa α -amilase termofilik memiliki aktivitas antara 60-80°C dan kehilangan aktivitasnya pada temperatur di bawah 40°C (Vielle., 2001). Sedangkan enzim α -amilase ekstraseluler dari isolat bakteri termofil SW2 menjadi tidak aktif pada 100°C.

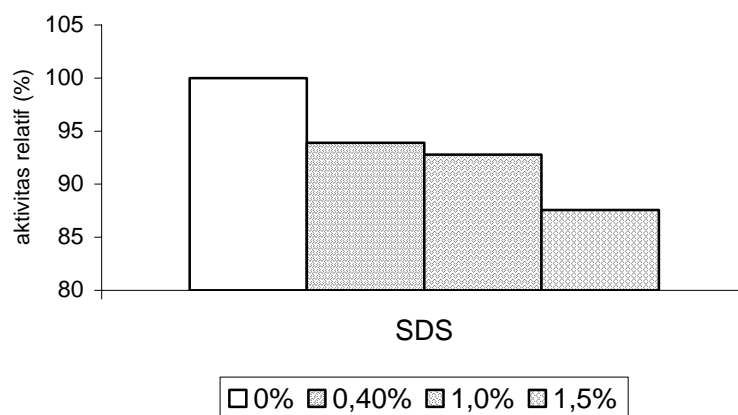
Penentuan pH optimum enzim α -amilase ekstraseluler dari isolat bakteri termofil SW2 ini dilakukan pada suhu 60°C. Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada pH 6. Aktivitas enzim relatif masih tinggi baik pada pH 5 maupun pada pH antara 7 – 9 akan tetapi pada pH di bawah 5 dan di atas pH 9 aktivitas enzim menurun drastis.

3.3. Pengaruh berbagai ion logam dan senyawa pendenaturasi

Untuk mengetahui pengaruh beberapa ion logam terhadap aktivitas enzim, maka dalam percobaan ini digunakan beberapa senyawa garam klorida, yaitu: KCl, FeCl₃·6H₂O, NaCl, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂·6H₂O, NiCl₂·6H₂O, ZnCl₂, MnCl₂·4H₂O. Senyawa garam klorida digunakan karena aktivasi α -amilase menurun sesuai urutan Cl⁻ > Br⁻ > I⁻ (Bush., 1989). Penambahan ion K⁺ pada konsentrasi 1 mM menurunkan aktivitas enzim sebesar $\pm 4\%$, sedangkan pada konsentrasi 5 mM dan 10 mM ion K⁺ meningkatkan aktivitas enzim masing-masing sebesar $\pm 2\%$ dan $\pm 4\%$. Ion Na⁺ menaikkan aktivitas enzim pada konsentrasi 1



Gambar. 3 Pengaruh ion logam, senyawa pengkelat dan pendenaturasi protein terhadap aktivitas α -amilase ekstraseluler SW2



Gambar. 4 Pengaruh berbagai konsentrasi deterjen anionik (sulfonil dedosil sulfat) terhadap aktivitas α -amilase ekstraseluler SW2

mM dan 5 mM masing-masing sebesar $\pm 6\%$ dan $\pm 2\%$, sedangkan pada konsentrasi 10 mM ion Na^+ menurunkan aktifitas enzim sebesar $\pm 2\%$. Pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM ion Ca^{2+} menaikkan aktivitas enzim masing-masing sebesar $\pm 2\%$ dan $\pm 3\%$, sedangkan pada konsentrasi 10 mM ion Ca^{2+} menurunkan aktivitas enzim sebesar $\pm 7\%$. Ion Mn^{2+} menaikkan aktivitas enzim sebesar $\pm 5\%$ pada konsentrasi 1 mM, selanjutnya kenaikan konsentrasi ion Mn^{2+} menyebabkan aktivitas enzim menurun yaitu sebesar $\pm 1\%$ pada 5 mM dan $\pm 12\%$ pada 10 mM. Ion Mg^{2+} menurunkan aktivitas enzim, dan penurunannya sejalan dengan bertambahnya konsentrasi ion Mg^{2+} , pada konsentrasi 1 mM, 5 mM dan 10 mM, aktivitas enzim menurun masing-masing sebesar $\pm 8\%$, $\pm 10\%$ dan $\pm 20\%$. Ion Zn^{2+} dan Fe^{3+} menyebabkan enzim sama sekali tidak aktif baik pada konsentrasi 1 mM, 5 mM maupun 10 mM. Begitu pula dengan ion Ni^{2+} pada konsentrasi 5 mM dan 10 mM, pada konsentrasi ion Ni^{2+} 1 mM aktivitas enzim turun sampai dengan $\pm 24\%$. Berdasarkan data tersebut (Gambar 3) maka terdapat empat macam ion logam yang dapat meningkatkan aktivitas α -amilase hasil isolasi yaitu K^+ , Na^+ , Ca^{2+} dan Mn^{2+} serta tiga macam ion logam yang dapat menghilangkan aktivitas α -amilase hasil isolasi yaitu Ni^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{3+} .

Pada Gambar 3 adanya penambahan EDTA (sebagai pengkelat logam) pada berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa aktivitas enzim α -amilase ini hampir seluruhnya hilang.

Dari data tersebut, α -amilase hasil isolasi dapat digolongkan sebagai α -amilase logam.

Untuk mengetahui adanya pengaruh deterjen anionik, maka dalam percobaan digunakan SDS dengan konsentrasi sebesar 0,4%, 1,0% dan 1,5%. Dari data hasil percobaan (Gambar 4) terlihat aktivitas enzim menurun sejalan dengan bertambahnya konsentrasi SDS.

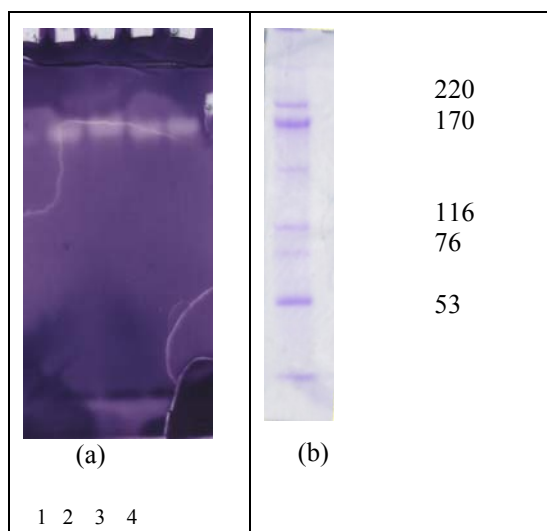
Urea sebagai agen pendenaturasi protein juga mempengaruhi aktivitas enzim. Pada Gambar 3 konsentrasi urea 1 mM aktivitas enzim naik sampai $\pm 6\%$. Selanjutnya aktivitas enzim menurun sejalan dengan bertambahnya konsentrasi urea. Pada konsentrasi urea 5 mM dan 10 mM aktivitas enzim menurun masing-masing sebesar $\pm 1\%$ dan $\pm 20\%$.

3.4. Gel Elektroforesis

Dari hasil elektroforesis (Gambar 5) diperoleh satu pita protein yang menunjukkan aktivitas katalitik enzim terhadap substrat pati. Terdapat beberapa hasil penelitian yang

melaporkan bahwa isolasi α -amilase dari sumber mikroorganisme termofilik akan menghasilkan dua bentuk enzim α -amilase. Menurut Long-Liu Lin *et al* (1998) apabila sumber karbon yang digunakan pada fermentasi berasal dari pati terlarut akan teridentifikasi dua pita amilase dengan berat molekul sekitar 150 dan 42 kDa. Akan tetapi apabila sumber karbon berasal dari pati mentah hanya satu pita amilase dengan berat molekul sekitar 150 kDa yang dapat teridentifikasi, karena protein dengan berat molekul 42 kDa kemungkinan diabsorpsi oleh sumber karbon yang tidak larut

dalam air. Percobaan ini menggunakan pati mentah yang berasal dari kentang sehingga hanya amilase dengan berat molekul yang besar dapat teridentifikasi. Dengan menggunakan standar berat molekul diperkirakan pita protein yang memiliki aktivitas mengkatalisis pati tersebut memiliki berat molekul sekitar 180 kDa.



Gambar. 5. a.) Hasil uji elektroforesis (SDS-PAGE) enzim kasar α -amilase ekstraseluler SW2 (1 dan 2 = native enzim; 3 dan 4 = enzim yang terdenaturasi); b) penanda berat molekul protein

4. Kesimpulan

Karakterisasi terhadap enzim kasar α -amilase hasil isolasi dari bakteri termofil SW2 telah berhasil dilakukan. Diketahui bahwa enzim ini merupakan enzim ekstraseluler dengan temperatur dan tingkat keasaman optimum berturut-turut pada 70°C dan pH 6,0. Sebagai tambahan, penelitian ini berhasil mengidentifikasi pengaruh ion-ion logam dan senyawa-senyawa pendenaturasi terhadap aktivitas katalitiknya. Karakter penting lainnya seperti kestabilan aktivitas menunjukkan bahwa aktivitas enzim dapat dipertahankan pada temperature yang relative rendah selama proses penyimpanannya (hasil tidak dicantumkan dalam makalah ini).

5. Ucapan terima kasih

Penelitian ini dibiayai atas dana hibah Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Kementerian Ristek Republik Indonesia. Peneliti sangat berterimakasih atas fasilitas yang diberikan untuk melaksanakan sebahagian dari

penelitian ini kepada Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi (PPPT), Serpong.

6. Daftar Pustaka

Boyer, R.F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. 2nd edition. Benjamin/ Cumming Publishing. London.

Bradford, M.N. (1976). A rapid and sensitive method for quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

Bush, D.S., L. Sticher, Huystee, R. van, D. Wagner, & R.L. Jones. 1989. The Calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone α -amilase. *J. Biol. Chem.* **246** (32): 19392-19398.

Copeland, R.A. 1994. *Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols*. Chapman and Hall. New York.

Dyah, P.M. 1995. Studi tentang enzim amilase penghidrolisis pati mentah ubi kayu dari *Streptomyces sp.* no. 4. *Prosiding Seminar Bioteknologi Biomassa BPPT I*. Jakarta.

Jei-Fu Shaw, Fu-Pang Lin, Su-Chiu Chen & Hsing-Chen Chen. 1995. Purification and properties of an extracellular α -amilase from *Thermus sp.* *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **36**: 195-200.

Kruger, N.J. 1994. *The Bradford method for protein quantitation*. Di dalam J.M. Walker, (ed.). *Methods in molecular biology, vol 32: Basic protein and peptide protocols*. Humana Press. New Jersey.

Long-Liu Lin, Chang-Cherng Chyau, & Wen-Hwei Hsu. 1998. Production and properties of raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 61-68.

Taji, N. 1988. *Industrial utilization of α -amilase*. Di dalam The Amylase Research Society of Japan, (ed.). *Handbook of amylase and related enzymes: Their sources, isolation methods, properties and applications*. 1st edition. Pergamon Press. New Jersey.

Trismilah, Sumaryanto, Esti, W. 2000. Enzim α -amilase dari *B. stearothermophilus* DSM22 menggunakan kulit buah pisang nangka sebagai substrat. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya.

Vielle, C., G.J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanism for thermostability. *Microbiology and Molecular biology Reviews*. **65** (1): 1-43.

Widyasti, E. 2002. Isolasi dan optimasi suhu dan pH pertumbuhan bakteri termofil penghasil α -amilase

Siswati Setiasih, Budiasih Wahyuntari, Trismilah, dan Dewi Apriliani

termostabil. *Seminar Masalah Khusus Jurusan Biologi FMIPA IPB*. Bogor.

Wiseman, A., (ed.). 1979. *Topics in enzymes and fermentation biotechnology*. Ellis Horwood Limited. New York.



Kandungan Senyawa Kimia dari Tanaman *Garcinia Spp* Yang Tumbuh di Indonesia

Soleh Kosela

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Abstract

Senyawa kimia yang diisolasi dari tanaman Garcinia mempunyai variasi tertentu, yaitu dari kerangka xanton, flavonoid, triterpenoid dan quinon. Dari buah Garcinia dulcis berhasil diisolasi senyawa dioksimorelin, asam morellat dan morellin, sedang daun Garcinia dulcis berhasil diisolasi senyawa dulxanton E, F, G dan H. Ekstrak kulit batang Garcinia picrorrhiza mengandung senyawa garcinopikrophenon, triterpenoid asam (24 E)-3 β -hidroksi -7,24-euphadien-26-oat, asam lanosta-7,24-dien 3-oxo-27 oat, asam 3 β -hidroksi-7,24-euphadien-26 oat dan garcinopicrobenzophenonon pada kulit batang Garcinia porecta ditemukan porxanthon dan triterpenoid. Beberapa senyawa xanthon dan benzofenon diisolasi dari daun Garcinia rigida dan Garcinia benthani Piere yang akan kami bahas. Semua tanaman Garcinia ini diambil di daerah Bogor dan Kalimantan. Aktivitas biologi ditentukan di Universitas Indonesia dan The National University of Singapore. Penentuan Struktur Molekul menggunakan NMR, Infra Red, Ultraviolet, Mass spektrometer dan X-Ray difraksi.

Paper is not available

Quantitative Analysis of Trace *pp*-DDE in Cod Liver Oil by Isotope Dilution Mass Spectrometry during APMP.QM-P4 Pilot Study and Uncertainty Evaluations

Sri Sumartini, Nuryatini, Sumardi

Research Institute for Chemistry –Indonesian Institute of Sciences
Kompleks PUSPIPTEK, Ds Setu, Cisauk, Tangerang 15314, Banten
Email srisunartoto@yahoo.com

Abstract

The organochlorine pesticide *p,p'*-DDE (*p,p'*-dichlorodiphenyl)dichloroethylene) is a breakdown product of the well-known persistent pesticide *p,p'*-DDT, which has been banned in many countries due to health concerns. *p,p'*-DDE is a typical example of an organochlorine pesticide of environmental importance, and is an analyte that many countries around the world routinely test for.

The paper deals with the Quantitative Analysis of Trace *pp*-DDE in Cod Liver Oil by Isotope Dilution Mass Spectrometry and Uncertainty Evaluations was carried out during APMP.QM-P4 Pilot Study of organized by APMP (Asia Pasific Metrology Program) in 2004 and coordinated by National Analytical Reference Laboratory, National Measurement Institute, Australia.

This intercomparison study was attending by 12 countries including Indonesia represented by Research Institute for Chemistry –Indonesian Institute of Sciences (Laboratory No.4).

The result obtained for *pp*-DDE in Cod Liver Oil was 146,75 ng/g with expanded uncertainty 8,4%. The median obtain from this laboratory intercomparison study was 160,35 ng/g. The results of the study are also reported here.

Key words; *p,p'*-DDE, IDMS, uncertainty, GCMS.

1. Introduction

In modern industrial era, measurements in chemistry are closely linked with commercial and public affairs such as trade, regulation, health and safety. Therefore, making measurement results of a specific laboratory reliable and comparable to other laboratory worldwide are highly demanded. Comparability and reliability of a measurement result can be achieved by making the property of the measurement result traceable to long-term stable references which are ultimately anchored to physical principles of nature, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties. This can be best done by linking all measurement to the SI. Keeping a traceability chain to the SI unit makes all measurement results internationally comparable regardless of measurement entities and sample matrix (Kim, 1999).

The realization of the SI unit are usually kept in each country by national metrology institute as the national standards of measurement. The national metrology institute provides the realization of the SI unit by primary methods which stand alone and do not need any references of the same quantity.¹ International traceability and uniformity of measurement is then established on a world-wide scale through a mechanism of high-level comparisons between the national metrology institute. The Committee Consultatif pour la Quantite de Matiere (CCQM), established by the Committee International des Poids et Mesures (CIPM) in 1993, has taken the lead in the development of the metrology system in chemistry.

Since a typical chemical measurement consists of a number of measurement steps, it requires careful design of measurement procedure to keep the traceability chain to the SI unit.To

make a measurement result traceable to the SI unit, it is also necessary to evaluate the uncertainty of every step in the measurement procedure and combine them to meet the principles of the internationally agreed guide, ["Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" provided by International Organization for Standardization (ISO) in 1993]. The guide establishes general rules for evaluating and expressing uncertainty in the broad spectrum of measurement and is accepted in all field of measurement. However, it is very difficult to estimate and combine uncertainties for every step involved in chemical measurements following the ISO guide due to the complexity of the procedures. Recently, Eurachem provided a document, ["Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", Eurachem, 1995], describing how the concepts in the ISO guide can be applied in chemical measurements. Though the document has been a useful guideline for analytical chemists, it is still important to provide a practical guidance on estimating uncertainty for each of widely used chemical measurement method to make the ISO guide properly applicable.

A few chemical measurement methods are recognized as primary methods that make the measurement results traceable to the SI units directly without significant empirical correction factors. Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) has been considered as strong candidate of a primary method for the analysis of trace organic compound in complex matrix (Kim, 1999).

As IDMS method overcomes difficulty of correcting recovery yield in sample preparation and separation, it has been widely accepted as a reliable analysis method for highly accurate determination in clinical chemistry, toxicology, food and drug analysis, and environment analysis. To test feasibility of IDMS as a primary method for the analysis of trace organic compounds and the international uniformity of the measurement, Research Institute for Chemistry –Indonesian Institute of Sciences (LIPI) participated in intercomparison programs with several national metrology institute in the intercomparison of environmental analysis, (*p,p'*-dichlorodiphenyl)dichloroethylene (*pp'*-DDE) in cod liver oil.

In this report, we provide result of the quantitative analysis of the cod liver oil sample and description of the procedures² for the evaluation of the uncertainty of the result of the IDMS measurement. This report also describes details on experimental conditions used to increase the accuracy of the IDMS measurement and the result during APMP.QM-P4 Pilot Study .

2. Experimental

The IDMS measurement consist of spiking a known amount of isotope-enriched *p,p'*-DDE ¹³C₁₂ to a known amount of cod liver oil, clean-up of the sample to separate oil matrix, and GC/MS measurement of the extract. The measured isotope ratio of spike cod liver oil sample was calibrated by bracket method using two calibration known amounts of *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDE ¹³C₁₂.

Methodology

Materials :

Two bottles of sample of cod liver oil from NARL, Australia.

p,p'-DDE ¹³C₁₂ spike solution from NARL, Australia.

¹²C *p,p'*-DDE standard (99,6 %) was supplied from APMP – QM – P1, LGC 110, vial no. 23 and ¹³C *p,p'*-DDE standard solution was supplied from APMP – QM – P1, LGC 110, vial no. 13 (2001).

Petroleum benzene (boiling point 40 – 60 °C) is from E.Merck.

Al₂O₃ basis (Art. 1076) is from E.Merck.

Instrument :

Balance AT 200 Mettler Toledo max = 205 gram, d = 0,1 mgram.

Gas Chromatography (Trace GCQ 2000), Mass Spectrometer (Finnigan MAT).

EI mode; Ion measure ; m/z = 318 for ¹²C*p,p'*-DDE and m/z = 330 for ¹³C*p,p'*-DDE

Instrument condition :

GC Instrument

Column DB5MS ; 30 m long ; 0,25 mm i.d ; 0,25 µm film thickness.

Temperature of injector 250 °C

Temperature of GC oven was adjusted at 150 °C for 1 minute and then ramped to 300 °C in the rate of 20 °C/minute and then maintained for 3 minute at 300 °C.

MS instrument

SIM mode, Ion source temperature 270 °C, Ion impact ionization condition was 70 ev, Helium was used as carried gas (flow rate 1 ml/minute) and samples was injected in a splitless mode.

Clean up procedure (Baumann, R.A., et al., 1996) :

300 ± 0.01 mgram of samples was mixed with 18.5 mgram of ¹³C_{p,p}-DDE and dissolved in 3 ml of petroleum ether (boiling point ± 40 – 60 °C), then cleaned up in glass open column (i.d 10 mm) containing of 4 gram of alumina (previously heated at 500 °C) which was deactivated by 9 gram of water for each of 100 gram of alumina and kept overnight. The samples was eluted by 25 ml of petroleum ether (boiling point ± 40 – 60 °C) and the eluate was evaporated until 0,5-1 ml and 2 µl was injected to GCMS.

Calibration Procedure :

Stock solution of solid p,p-DDE was weighed (0,592 mgram) and diluted with 10 ml of isooctane. The concentration of the resulting solution is = 87,3517 µgram/gram.

For making two point calibration solution (working solution), the stock standard solution was diluted to solution with concentration 3,6688 µgram/gram.

Each mix solution was subjected to analysis by a GCMS three times with electron impact (EI) mode. The ion of m/z 318 (for ¹²C) and m/z 330 (for ¹³C) was monitored in selected ion mode (SIM). The height ratio of m/z 318 and m/z 330 was calculated.

The formula for calculation of C¹²_{p,p}-DDE in the sample (Cx) is :

$$C_x = \frac{M_{sp}}{M_x} \cdot x C_s \cdot Q$$

$$Q = \left[\left(\frac{AR_x - AR_1}{AR_2 - AR_1} \right) (MR_2 - MR_1) + MR_1 \right]$$

Where :

C_x = concentration of C¹²_{p,p}-DDE in the sample

C_s = concentration of C¹²_{p,p}-DDE in the standard calibration

M_{sp,x} = weight of C¹³_{p,p}-DDE added to the sample

M_x = weight of sample

MR_i (1,2) = mass of calibration standard i (1,2)

AR_i (1,2) = height ratio of C¹²_{p,p}-DDE/ C¹³_{p,p}-DDE in standard solution

AR_x = height ratio of C¹²_{p,p}-DDE/ C¹³_{p,p}-DDE in sample

Calculation of uncertainty budget are recording to the formulae written by Kim et., al.,1999.

3. Result and Discussion

1. In this comparison study twelve laboratories was participate i.e laboratory no 1,2,33,4,5,6,7,8,9,10, 11 and 12. .

2 All experiment result from RCC –LIPI laboratory are shown in Table 1, 1a, and 1b.

For making two point calibration solution (working solution), the stock standard (¹²C) solution was diluted to solution with concentration 3,6688 µgram/gram. And then this standard solution was pipeted 140 µl (¹²C p,p'- DDE) and mix with 500 µl (¹³C p,p'- DDE). For calibration point no.2 , ¹²C p,p'- DDE organochlorine was pipeted 500 ul and mixed with 500 µl (¹³C p,p'- DDE). Each mix solution was subjected to analysis by a GCMS three times with electron impact (EI) mode. The ion of m/z 318 (for ¹²C) and m/z 330 (for ¹³C) was monitored in selected ion mode (SIM). The height ratio of m/z 318 and m/z 330 was calculated., The result was shown in **Table 1.**

Two vials (cod liver oil no.53 and 3) was accepted for analysis , clean up by alumina column, evaporated the eluate and then were analyzed by GCMS. The result is shown in **Table 1a and 1b.**

As could be seen in Table 1a and 1b , mean of concentration of ¹²C p,p'-DDE found in the Cod Liver Oil from sample no. 3 and 53 is 146.75 (ngram/gram) and after calculated, the

Table 1.
Result of analysis of p,p'-DDE mix standard carried out by RCC laboratory.

No	Weight of ¹² C (gram)	Weight of ¹³ C (gram)	Final Weight (gram)	Conc. of ¹² C in the mix standards (μgram/gram)	Conc. of ¹³ C in the mix standards (μgram/gram)	Ratio of Conc of ¹² C/Conc. of ¹³ C	Height Ratio of ¹² C/ ¹³ C ± RSD
1	0,0967	0,3434	0,4401	0,81	6,66	0,12	0,12 ± 0,0%
2	0,3463	0,4025	0,7488	1,711	4,585	0,37	0,37 ± 8,1 %

Table 1a.
Analysis result of p,p'-DDE in sample Cod Lever Oil Vial No.53

No	Sample code	Weight of sample (gram)	Weight of sample taken into the aluminacol umn (gram)	Weight of ¹³ C taken into the aluminacol umn (gram)	Height ratio of ¹² C/ ¹³ C found from GCMS	Concen. of ¹² C found in the cod liver oil (μgram/gram)	Mean of Conc. of ¹² C found in the cod liver oil (ngram/gram)
1.	I	0,3097	0,3097	0,0195	0,20	0,1478	132,8
					0,21	0,1178	
2.	II	0,3071	0,3071	0,0185	0,29	0,1967	156,9
					0,22	0,1171	
3.	III	0,3010	0,3010	0,0177	0,26	0,1726	141,3
					0,21	0,1100	
4.	IV	0,3007	0,3007	0,0191	0,24	0,1747	152,6
					0,23	0,1305	
5.	V	0,3074	0,3074	0,0189	0,25	0,1759	156,8
					0,25	0,1376	
						Mean	148,08

Table 1b.
Analysis result of p,p'-DDE in sample Cod Lever Oil vial No.3

No	Sample code	Weight of sample (gram)	Weight of sample taken into the column (gram)	Weight of ¹³ C taken into the column (gram)	Height ratio of ¹² C/ ¹³ C	Concen. of ¹² C found in the cod liver oil (μgram/gram)	Mean of Conc. of ¹² C found in the cod liver oil (ngram/gram)
1.	B	0,3063	0,3063	0,0179	0,22	0,1479	134,00
					0,23	0,1201	
2.	C	0,3070	0,3070	0,0171	0,28	0,1757	150,15
					0,25	0,1246	
3.	D	0,3028	0,3028	0,0181	0,24	0,1645	138,15
					0,21	0,1118	
4.	E	0,3052	0,3052	0,0177	0,23	0,1532	152,6
					0,29	0,1511	
5.	V	0,3074	0,3074	0,0184	0,25	0,1713	152,65
					0,25	0,1340	
						Mean	145,42

combined uncertainty by is 6.1519 (ngram/gram) and the expanded uncertainty is 12.3038 (ngram/gram).

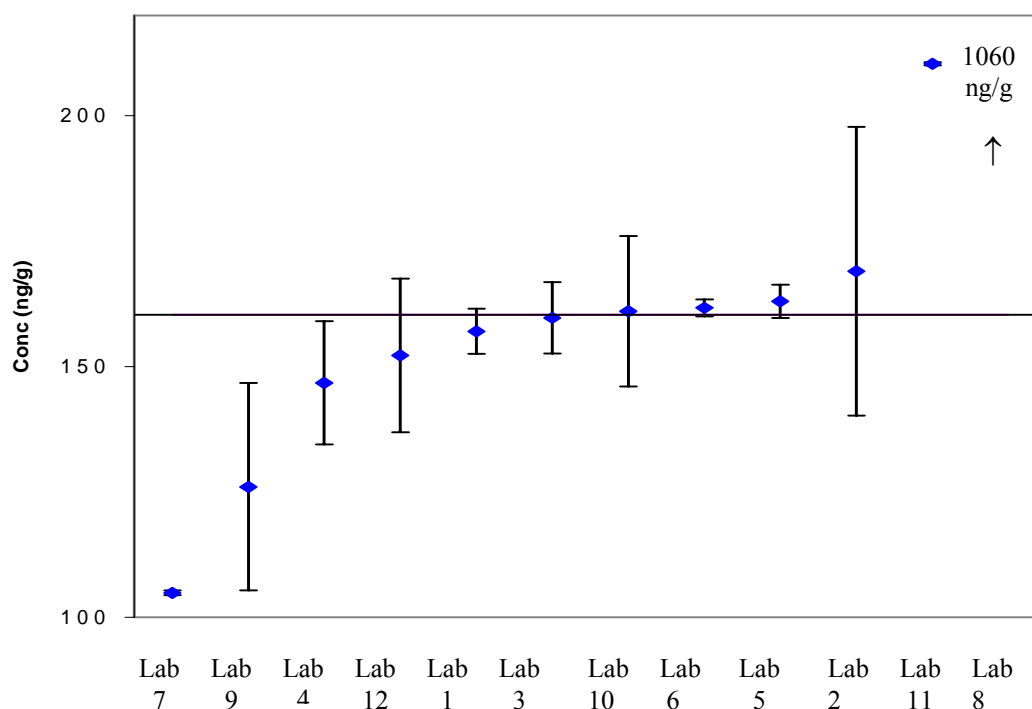
If the result are compared to other laboratories, the result of p,p'-DDE analysis can be seen in

Table 2 and the summary of result of all laboratories can be seen in **Figure 1 (Mackay, 2005).**

From **Figure 1** it can be concluded that the analysis result from RCC-LIPI is rather far

Table 2. Results of analysis *p,p'*-DDE in the cod liver oil from 12 laboratories (Mackay, 2005)

Lab. No.	Reported result bottle 1 (ng/g)	Reported result bottle 2 (ng/g)	Reported mean result (ng/g)	Standard Uncertainty (ng/g)	Expanded Uncertainty (ng/g)
1	157.7	156.4	157.0	2.1	4.5
2	167	171	169	14.4	28.8
3	159.7	159.8	159.7	3.6	7.1
4	148.08	145.42	146.75	6.15	12.30
5	163.3	162.7	163.0	1.7	3.3
6	162.2	161.2	161.7	0.8	1.7
7	104.75	104.95	104.85	0.23	0.46
8	1066	1053	1060	113	226
9	131	121	126	10.3	20.7
10	160	161	161	Not reported	15
11	162.08	258.68	210.38	0.167225847	0.3344516
12	154.7	149.6	152.2	7.67	15.34

Figure 1. APMP.QM-P4 Cod Liver Oil Results (Mackay, 2005)

from median value and has large uncertainty (see **Table 2**) although RCC-LIPI using IDMS as a primary method of analysis. The closer value of analysis to median value are Laboratory no. 1, 2, 3, 5, 6, 10, and 12. The bad accuracy result of RCC-LIPI laboratory it may cause by not large enough sample introduce to alumina clean up column and may cause by the clean up procedure using alumina is not suitable for cleaning pesticide from high fat content of the samples or wrong value of calibration standard. All laboratories except RCC-LIPI were using more than 1,0

gram for clean up and almost laboratories using GPC or flourisil column method for clean up (**Mackay, 2005**).

In general the results of RCC-LIPI are better than laboratory no. 7, 9, 11 and 8. More laboratories are now employing techniques such as isotope dilution mass spectrometry (IDMS) to improve the accuracy of their methods as done by RCC-LIPI, although some GC-ECD results show excellent comparability (Thailand) (**Mackay, 2005**) and this highlights the importance of the other factors in analysis

such as effective sample clean-up and effective standard preparation and calibration.

4. Acknowledgement

The authors wish to thank Miss Ratih and Resti for their assistance in the operating GC and GCMS; Mrs Hasri from Pesticide Laboratory, Agriculture Department, Pasar Minggu, Jakarta for her assistance in preparing alumina for samples clean up and Mr. Harry Budiman for his assistance in the calculating uncertainty budget.

5. References

1. Mackay, L.G., APMP.QM-P4 Pilot Study – Determination of *p,p'*-DDE in Fish Oil, Draft

Report, 7 February 2005, National Analytical Reference Laboratory, National Measurement Institute, Australia (Coordinating Laboratory)

2. Kim, B. et al., Quantitative Analysis of Trace *p,p'*-DDE in Corn Oil by IDMS: Uncertainty Evaluation Bull. Korean Chem.Soc., 1999, Vol.20, no.8.
3. Baumann R.A. et al., Analytical Method for Pesticide Residues in Food Stuffs, Sixth Edition, 1996. General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Public Health, Welfare and Sport, the Netherland

Senyawa Oligomer Resveratrol Dari Kulit Batang *Shorea Platyclados* (Dipterocarpaceae)

Siti Aisyah,* Yana M. Syah,* Sjamsul A. Achmad,* Euis H.Hakim,* Lukman Makmur,* Lia D. Juliawaty,* Laily B. Din,** Jalifah Latif,** Ikram M. Said.**

*Kelompok Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca 10, Bandung 40132, Indonesia

** School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor D.E. Malaysia

Abstrak

Suatu trimer resveratrol (+)- α -viniferin (**1**) telah berhasil diisolasi untuk pertama kalinya dari ekstrak aseton kulit batang *Shorea platyclados*. Struktur senyawa ini telah ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, serta melalui perbandingan terhadap data senyawa sama yang telah dilaporkan.

Kata kunci : (+)- α -viniferin, Dipterocarpaceae, *Shorea platyclados*

1. Pendahuluan

Dipterocarpaceae merupakan kelompok tumbuhan yang tersebar di daerah tropika Asia meliputi daerah Semenanjung Malaysia, Sumatera dan Kalimantan, Brunei, Filipina hingga Irian Jaya. Menurut Cronquist (1986) famili ini merupakan famili tumbuhan yang relatif cukup besar yaitu terdiri dari 16 genus dan sekitar 600 spesies. Salah satu genus utama dari famili ini adalah *Shorea* dengan perkiraan jumlah spesies sebesar 150 spesies.

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan famili Dipterocarpaceae antara lain adalah senyawa fenol seperti golongan oligostilbenoid, flavonoid, fenil propanoid, dan turunan asam fenolat, disamping senyawa non fenol seperti golongan triterpenoid. Penelitian fitokimia terhadap famili ini banyak dilakukan untuk mempelajari kelompok senyawa oligostilbenoid, suatu kelompok senyawa dengan monomer resveratrol yang sering kali mengandung satu atau lebih cincin heterosiklik oksigen dalam bentuk trans-2-aril-2,3-dihydrobenzofuran. Disamping itu senyawa oligostilbenoid ini menunjukkan aktifitas biologi yang penting seperti antibakteri, antifungal,

antioksidan, antihepatotoksik, antiinflamasi, sitotoksik, inhibitor enzim 5- α -reduktase dan enzim asetilkolinesterase, terutama dari golongan oligostilbenoid.

Pada makalah ini kami akan melaporkan isolasi senyawa trimer resveratrol (+)- α -viniferin (**1**) yang diperoleh dari ekstrak aseton kulit batang *Shorea platyclados* Sloot. ex. Foxw. Penentuan struktur senyawa ini telah ditetapkan berdasarkan data spektroskopi UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, serta melalui perbandingan data fisik dan spektroskopi terhadap data senyawa sama yang telah dilaporkan.

2. Percobaan

Umum. Pada percobaan ini, titik leleh ditentukan dengan menggunakan alat Fisher John. Spektrum UV dan IR diukur masing-masing dengan spektrofotometer Varian Cary 100 Conc. dan Spektrum One Perkin Elmer. Putaran optik ditentukan dengan menggunakan alat polarimeter Perkin Elmer 341 dalam pelarut MeOH. Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR ditentukan dengan spektrofotometer JEOL ECP400, yang beroperasi pada 500 MHz (^1H) dan 100,53 MHz (^{13}C). Kromatografi vakum cair (KVC) dilakukan dengan menggunakan Si

gel Merck 60 GF₂₅₄, kromatografi radial (kromatotron) menggunakan Si gel Merck 60 PF₂₅₄, dan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada pelat aluminium berlapis Si gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ 0,25 mm. Semua pelarut yang digunakan adalah yang berkualitas teknis yang didestilasi. Larutan 1,5% Ce(SO₄)₂ dalam 2N H₂SO₄ digunakan sebagai pereaksi penampak noda.

Bahan Tumbuhan. Kulit batang *Shorea platyclados* Sloot. ex. Foxw. diperoleh dari kebun percobaan Darmaga, Bogor, Jawa Barat yang dikumpulkan pada bulan maret 2003. Spesimen tumbuhan ini diidentifikasi oleh staf Herbarium Bogoriense, Bogor.

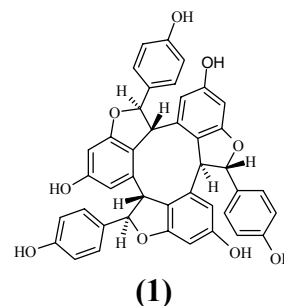
Ekstraksi dan Isolasi. Serbuk kulit batang *Shorea platyclados* sebanyak 2,7 kg diekstraksi dengan menggunakan aseton sebanyak 3 kali berturut-turut menghasilkan 120 gram ekstrak aseton. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dipartisi dengan dietil eter sehingga didapat ekstrak aseton-eter sebanyak 60 gram. Sebagian (40 gram) dari ekstrak aseton-eter selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi vakum cair menggunakan eluen n-heksan-etil asetat dengan kepolaran yang terus ditingkatkan menghasilkan lima fraksi utama yaitu fraksi A, B, C, D dan E. Fraksi C selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi vakum cair dengan menggunakan eluen n-heksan-etil asetat dengan kepolaran yang terus ditingkatkan dan diikuti dengan pemurnian dengan menggunakan kromatografi radial menggunakan eluen kloroform-metanol. Dari gabungan fraksi 11-16 diperoleh senyawa (+)- α -viniferin (**1**) (150 mg).

(+)- α -viniferin (**1**), diperoleh berupa serbuk warna kuning, t.l.230-232°C (terurai); $[\alpha]_D^{20} +30^\circ$ (c 0,1 MeOH); UV(MeOH) λ_{maks} (log ϵ): 203, 229 (bahu), 285; UV(MeOH + NaOH) λ_{maks} (log ϵ): 207, 248 (bahu), 294; IR(KBr) ν_{maks} (cm⁻¹): 3401(gugus -OH), 1615, 1515, 1486, 1441(C=C benzena), 1244, 1171, 1125, 1113 (oksiaril), 996, 831, (*para*-disubstitusibenzena).; ¹H NMR (aseton-*d*₆, 399,65 Mhz) δ (ppm) : lihat tabel 1; ¹³C NMR (aseton-*d*₆, 100,40 Mhz) δ (ppm) : lihat tabel 1.

4. Hasil dan Pembahasan

Senyawa (+)- α -viniferin (**1**) diperoleh sebagai serbuk warna kuning dengan titik leleh 230-

232°C (terurai) dan putaran optik +30°. Spektrum UV senyawa **1** memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203, 229 dan 285 yang mengindikasikan adanya kromofor fenolik yang tidak terkonjugasi. Adanya kromofor ini juga diperkuat dengan adanya pergeseran bathokromik (pergeseran pada panjang gelombang yang lebih besar) ketika dilakukan penambahan reagen geser NaOH. Spektrum IR senyawa ini menunjukkan adanya pita serapan untuk gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3401cm⁻¹, C=C aromatis pada 1615, 1515, 1441 cm⁻¹, oksil aril pada 1244 cm⁻¹, serta para disubstitusi benzen pada 831 cm⁻¹. Data UV dan IR diatas memberi petunjuk bahwa senyawa **1** adalah senyawa turunan fenol. Spektrum ¹³C NMR senyawa **1** menunjukkan sederet sinyal yang mengindikasikan adanya 6 karbon alifatik (δ_C 45,7-95,0), 18 karbon metin aromatik (δ_C 96,0-128,1), 9 karbon kuarternar (δ_C 105,6-140,5) dan 9 karbon oksil aril (δ_C 157,3-161,7). Sementara itu spektrum ¹H NMR senyawa ini menunjukkan sekumpulan sinyal yang dapat ditandai sebagai berikut; (i) tiga pasang proton metin aromatik berkopling-*orto* dari unit 4-hidroksifenil (δ_H 6,75-7,26), (ii) tiga pasang proton metin aromatik berkopling-*meta* dari unit 2,3-disubstitusi-5-hidroksifenil (δ_H 6,10-6,63), (iii) tiga pasang proton metin alifatik dari unit 2,3-dihidrobenzofuran (δ_H 3,99-6,02). Dari analisis spektrum ¹³C dan ¹H NMR tersebut, maka dapat disarankan bahwa senyawa **1** adalah α -viniferin. Dukungan selanjutnya diperoleh dari perbandingan data ¹³C dan ¹H NMR (Tabel 1), data fisik dan spektroskopi



terhadap data senyawa sama yang telah dilaporkan (Tabel 2).

Tabel 1. Data ^1H dan ^{13}C NMR senyawa 1

No. C	Senyawa 1		α -viniferin*	
	δ_{H} [multiplisitas, J (Hz), Integrasi]	δ_{C}	δ_{H} [multiplisitas, J (Hz), Integrasi]	δ_{C}
1a	-	132,0	-	131,4
2/6a	7,03 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	128,1	7,06 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	127,6
3/5a	6,72 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	115,7	6,75 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	115,1
4a	-	157,8	-	157,3
7a	6,07 (br s)	86,4	6,10 (br s, 1H)	85,8
8a	3,97 (br s)	46,4	3,99 (br s, 1H)	45,7
9a	-	118,8	-	118,2
10a	-	141,2	-	140,5
11a	5,99(d, $J=1,8$ Hz, 1H)	108,5	6,01 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	108,0
12a	-	159,3	-	158,8
13a	6,22(d, $J=1,8$ Hz, 1H)	98,0	6,25 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	97,4
14a	-	161,6	-	161,0
1b	-	132,2	-	131,6
2/6b	7,22 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	128,1	7,26 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	127,7
3/5b	6,77(d, $J=8,5$ Hz, 2H)	116,1	6,80 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	115,5
4b	-	158,2	-	157,7
7b	5,95 (d, $J=9,7$ Hz, 1H)	90,0	5,96 (d, $J=9,5$ Hz, 1H)	89,4
8b	4,71 (d, $J=9,7$ Hz, 1H)	52,8	4,73 (d, $J=9,5$ Hz, 1H)	52,3
9b	-	120,9	-	120,2
10b	-	139,7	-	139,1
11b	6,72 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)	106,2	6,76 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	105,6
12b	-	159,3	-	158,9
13b	6,25 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)	96,6	6,27 (d, $J=1,5$ Hz, 1H)	96,0
14b	-	160,6	-	160,0
1c	-	132,5	-	131,9
2/6c	7,08 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	128,6	7,08 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	128,1
3/5c	6,79 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	116,1	6,82 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	115,5
4c	-	158,3	-	157,8
7c	4,90 (d, $J=6,4$ Hz, 1H)	95,6	4,93 (d, $J=6,5$ Hz, 1H)	95,0
8c	4,61 (d, $J=6,4$ Hz, 1H)	55,6	4,65 (d, $J=6,5$ Hz, 1H)	55,0
9c	-	119,7	-	119,1
10c	-	138,7	-	138,1
11c	6,59 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)	105,8	6,63 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	105,2
12c	-	160,8	-	160,3
13c	6,22 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)	96,9	6,25 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	96,3
14c	-	161,7	-	161,1

*(+)- α -viniferin (*Caragana chamlagu*, Leguminosae; Kitanaka, 1990)

Tabel 2. Data fisik dan spektroskopi senyawa 1

Senyawa 1	(+)- α -viniferin*
Serbuk warna kuning	Serbuk warna kuning muda
Titik leleh 230-232 °C	Titik leleh 231-233 °C
UV (MeOH)	UV (MeOH)
λ_{maks} (nm): 203, 229(bahu), 285	λ_{maks} (nm): 210, 228 (bahu), 278 (bahu), 285 dan 294 (bahu)
IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3401, 1615, 1515, 831, 764	IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3400, 1613, 1597, 1514, 829, 805, 774 dan 763
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +30^{\circ}$ (c 0,1 dalam metanol)	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +50,7^{\circ}$ (c 1,02 dalam etanol)

*(+)- α -viniferin (*Caragana chamlagu*, Leguminosae; Kitanaka, 1990)

4. Kesimpulan

Pada penelitian terhadap tumbuhan *Shorea platyclados* telah berhasil diisolasi suatu trimer resveratrol (+)- α -viniferin (1).

5. Ucapan Terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada Herbarium Bogoriense, Bogor, yang telah membantu

mengidentifikasi spesimen tumbuhan. Terimakasih disampaikan pula kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana BPPS.

6. Daftar Pustaka

Aminah N.S., Achmad, S.A., Aimi N., Ghisalberti, E.L., Hakim E.H., Kitajima M., Syah Y.M., Takayama H., (2004). *The Indonesian Society of Natural Product Chemistry*, 4:1 27-34

I Nyoman Adi W., Achmad, S.A., Aimi, N., Hakim, E.H., Lia D.J., Syah, Y.M., M.I.C., (2003). *The Indonesian Society of Natural Product Chemistry*, 3:1 39-44

Ito, T., Tanaka, T., Ido, Y., Nakaya, K., Iinuma, M., Riswan, S., (2000). *Chem. Pharm. Bull.*, 48: 7 1001-1005

Ito, T., Tanaka, T., Ido, Y., Nakaya, K., Iinuma, M., Riswan, S., (2000). *Chem. Pharm. Bull.*, 48: 12 1959-1963

Kitanaka, S., Ikezawa, T., Yadukawa, K., Yamanouchi, S., Takido, M., Sung, H.K., and Kim, I.H., (1990), *Chem Pharm Bull.*, 38(2), 432-435

Tukiran; Achmad, S.A., Hakim, E.H., Lia D. J., Syah, Y.M., Kokki S., (2003) *The Indonesian Society of Natural Product Chemistry*, 3:1 24-31

Termodinamika pada Berbagai Ranah Keadaan dan Rekonstruksi Molekularnya.

Susanto Imam Rahayu
Departemen Kimia
Institut Teknologi Bandung.

Abstrak

Termodinamika merupakan ilmu yang merambah semua bentuk sistem di alam. Saat ini termodinamika berkembang bukan hanya di ranah keadaan setimbang, tetapi juga di daerah tak setimbang yang melibatkan proses-proses tak reversibel. Untuk itu akan dibahas bentuk termodinamika di tiga ranah keadaan, yaitu: keadaan setimbang, keadaan dekat setimbang dan keadaan jauh dari setimbang, yang masing-masing memiliki ciri dan perilaku tersendiri. Sejalan dengan itu berkembang pula pendekatan molekular pada keadaan setimbang, dekat setimbang dan jauh dari setimbang. Bila ranah setimbang telah sepenuhnya difahami, maka ranah dekat setimbang, yang secara nyata menggambarkan proses-proses yang berlangsung di alam, mulai difahami pada tataran fenomenologi maupun molekular. Sebaliknya, keadaan jauh dari setimbang masih merupakan tantangan besar, meskipun saat ini tampak perkembangan yang menarik. Berbeda dengan keadaan dekat setimbang yang dapat dikembalikan ke keadaan setimbang, sistem pada keadaan jauh dari setimbang tidak selalu dapat dikembalikan ke keadaan setimbang. Sistem semacam itu dxapat secara spontan berubah menghasilkan struktur baru yang belum ada sebelumnya dan tidak diramal sebelumnya, melalui proses yang dikenal sebagai self organization. Melalui konsep ini, yang dipelajari pada sistem-sistem terbuka, termodinamika mulai merambah berbagai sistem, antara lain: sistem biologi, sistem informasi dan sistem sosial. Akan dibahas apa yang harus dilakukan pada sistem perkuliahan kimia agar dapat mengantisipasi perkembangan ini di masa depan.

Paper is on page 1122

Isolasi, Purifikasi Dan Karakterisasi Lipoksigenase Dari Kacang Panjang (*Vigna sesquipedalis*)

Sumi Hudiyono¹⁾, Faika Dwiyanti²⁾ dan Susilowati HS¹⁾

1) Departemen Kimia FMIPA-UI

Depok 16424, Indonesia

hudiyono@makara.cso.ui.ac.id

2) Alumni Departemen Kimia FMIPA-UI

Depok 16424, Indonesia

Abstrak

Kacang panjang (Vigna sesquipedalis) mengandung lipid yang tersusun oleh 57% asam lemak esensial, linoleat (L, C18:2, ω6) dan linolenat (Ln, C18:3, ω3), sekaligus mengandung enzim pengoksidasinya, lipoksigenase. Isolat kasar lipoksigenase hasil ekstraksi dengan bufer borat 2,0 M pH 9,0; dipurifikasi berturut-turut dengan cara fraksinasi menggunakan (NH₄)₂SO₄, dialisis dan dilanjutkan dengan kromatografi penukar anion DEAE Selulosa. Penentuan aktivitas spesifik menggunakan substrat linoleat menunjukkan terbentuknya peningkatan aktivitas yaitu mulai dari 0,226 U/mg (ekstraksi), 0,418 U/ml (fraksinasi dengan 60-90% NH₄SO₄), 0,523 U/mg (dialisis) sampai 350,6 U/mg (kromatografi DEAE Selulosa) atau dengan pemurnian sebesar 1550,59 kali. Kondisi optimum reaksi diperoleh pada pH = 9,0, dan 30°C. Berdasarkan substrat alamiah dan kondisi optimumnya, maka Lipoksigenase yang diperoleh termasuk tipe I (L-1), atau lipoksigenase alkali, dengan penomoran E.C. 1.13.11.12.

Kata kunci : isolasi, lipoksigenase, purifikasi dan karakterisasi, tipe I, *Vigna sesquipedalis*.

1. Pendahuluan

Lipid mempunyai peran penting dalam diet, antara lain sebagai sumber energi dan penyedia asam lemak esensial. Asam lemak esensial merupakan kelompok asam lemak poliena ω6 dan ω3, antara lain adalah asam linoleat (L, C18:2, ω6) dan linolenat (Ln, C18:3, ω3), (Rao, 1995). Peranan asam lemak esensial antara lain adalah untuk pertumbuhan otak (Rao, 1995), berperan dalam sistem imun tubuh dan penglihatan (Clark, 1991), mencegah agregasi keeping darah sebagai pencegah arterosklerosis (Kwiterovitch, 1993; Ross, 1999).

Kebutuhan asam lemak esensial dapat dipenuhi dengan mengkonsumsi sumber lipid nabati seperti kacang panjang. Kacang panjang mengandung berbagai asam lemak, 57% diantaranya adalah asam lemak esensial berupa asam linoleat (55%) dan linolenat (2%), (Riana, 2000). Namun demikian kacang panjang secara

alami juga mengandung lipoksigenase (LOX) yang dapat mengoksidasi asam linoleat membentuk produk primer berupa hidroperoksida diena terkonjugasi. Hidroperoksida merupakan senyawa tidak stabil yang mudah teroksidasi lebih lanjut membentuk produk sekunder yaitu melalui proses degradasi menghasilkan produk volatil penyebab ketengikan (off flavour) serta membentuk kondensasi senyawa non-volatil seperti senyawa dimer dan siklik, (Gunston et.al, 1986). Produk sekunder ini bertanggung jawab terhadap perubahan cita rasa, bau, warna dan tekstur bahan makanan.

Lipoksigenase (linoleat : oksigen oksidoreduktase, E.C. 1.13.11.12) adalah enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi oleh oksigen pada asam lemak yang mengandung ikatan rangkap cis, cis pentadiena, seperti asam linoleat dan linolenat. Enzim ini tersebar luas pada tanaman, hewan (mamalia dan ikan) serta

mikroorganisme. Lipoksisgenase pada manusia berguna pada oksidasi asam arasinonat (An, C20:4 ω6) membentuk asam 5-hidroksi-6,8,11,14 eikosapentatetraenoat, suatu senyawa antara pembentukan leukotrien A₄, C, D dan E yang merupakan komponen penting pada sel darah putih. Leukotrien merupakan konstituen mediator reaksi inflamasi dan hipersensitivitas, (Chen et.al, 1994; Dwyer et.al, 2004; Ross, 1999). Pada tanaman, enzim ini diperlukan untuk pertumbuhan dan produksi senyawa antibakteri, (DKFZ, 2003). Lipoksisgenase banyak terdapat pada biji kacang-kacangan seperti kacang kedelai, kacang panjang, dan kacang tanah.

Ada dua jenis lipoksisgenase kacang kedelai yaitu lipoksisgenase tipe I (L-1) dan lipoksisgenase tipe II (L-2). L-1 merupakan lipoksisgenase alkali, memiliki aktivitas pada pH 9,0, bersifat stabil dan aktivitasnya tidak berkurang selama pemurnian, dengan Mr sebesar 102000. L-2 dikenal sebagai lipoksisgenase netral karena bekerja pada pH 6,5. Lipoksisgenase tidak aktif umumnya dalam bentuk keadaan fero (LOX-Fe²⁺), (Boyington, 1993).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi lipoksisgenase yang terdapat pada kacang panjang, penentuan kondisi optimum reaksi katalisisnya dan sekaligus tipe enzimnya.

2. Percobaan

Bahan dan Peralatan.

Biji kacang panjang diambil dari kacang panjang segar yang baru dipetik, diperoleh dari perkebunan kacang panjang di kampung Pekopen, desa Lambang Jaya, Tambun, Bekasi.

Bahan kimia yang digunakan antara lain asam linoleat, coomassie brilliant blue G 250, Bovine Serum Albumin (BSA), dan DEAE selulosa, (NH₄)₂SO₄ dan buffer borat. Larutan stok linoleat dibuat dengan cara menambahkan etanol 95 % pada 0,05 ml asam linoleat, diaduk sampai terbentuk emulsi, setelah itu ditambah dengan aquadest sampai volume 50,0 ml. Pada saat penggunaan, larutan stok diencerkan 6 kali dengan buffer borat 0,2 M pH 9,0. Reagen Bradford dibuat dengan cara melarutkan 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 dalam 50 ml etanol 95 %. Larutan ini kemudian dicampurkan dengan 100 ml asam fosfat 85 % dan diencerkan sampai 1,0 l dengan aquadest, selanjutnya disaring menggunakan kertas

saring Whatman No. 1. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol reagen untuk disimpan dalam lemari pendingin sampai saat digunakan. Pada saat digunakan, reagen ini perlu diencerkan terlebih dahulu sebanyak 5 kali dengan aquadest.

Peralatan yang digunakan antara lain : spektrofotometer UV/Vis Hitachi, Refrigerated Centrifuge Shimadzu, blender, membrane dialysis/selofan (43 x 27) cm kapasitas 175 ml/ft, kolom kromatografi penukar anion (33 x 1,7) cm, fraction collection, lemari pendingin, blender, pH meter, neraca analisis, pengaduk magnetik dan peralatan gelas serta peralatan pendukung lain.

Cara kerja

Isolasi Lipoksisgenase

Sebanyak 150 gram biji kacang panjang ditambah dengan 600 ml buffer borat 2,0 M pH 9,0; kemudian diblender selama satu menit dengan keadaan dingin. Homogenat yang diperoleh disaring dengan kain katun, filtrate selanjutnya disentrifugasi dengan *refrigerated centrifuge* pada 4° C dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar yang selanjutnya difraksinasi bertingkat dengan penambahan garam (NH₄)₂SO₄.

Penentuan Aktifitas Lipoksisgenase Ekstraks kasar

Sampel substrat dibuat dengan mencampurkan 0,95 ml buffer borat 0,2 M pH 9,0 dengan 2,0 ml larutan linoleat 0,2 M dan 0,05 ml larutan enzim kasar. Sebagai blanko digunakan campuran 1,0 ml buffer borat dan 2,0 ml larutan linoleat 0,2 M. Selanjutnya sampel dan blanko diinkubasi pada 30° C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan merendam tabung reaksi sampel dan blanko dalam air mendidih selama 3 menit.

Aktivitas enzim ditentukan berdasarkan pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi asam linoleat. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer UV pada λ 234 nm. Aktivitas spesifik dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{A_{234 \text{ nm}}}{30 \times 0,001 \times \text{mg protein total}}$$

Satu unit aktivitas dinyatakan sebagai kenaikan 0,001 absorbansi per menit pada 25° C diukur

pada panjang gelombang 234 nm, dengan volume sampel 3,0 ml, (William et.al, 2000).

Penentuan Kadar Protein Enzim Kasar.

Penentuan protein dilakukan berdasarkan metode Bradford. Sejumlah 100 µl larutan enzim kasar ditambah dengan 5,0 ml reagen Bradford dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer*. Setelah diinkubasi selama 15 menit, sampel diukur absorbansinya pada λ 595. Sebagai blanko, larutan enzim kasar diganti dengan aquadest, sedangkan larutan standar digunakan BSA dengan kadar 0,2 mg/l sampai 1,0 mg/l. Kadar protein enzim kasar ditentukan dengan cara mengekstrapolasikannya terhadap kurva standar.

Fraksinasi dengan Garam Amonium Sulfat

Ekstraks enzim kasar, selanjutnya difraksinasi dengan penambahan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada variasi kejenuhan 0-30 % (b/v); 30-60 % (b/v) dan 60-90 % (b/v). Pembuatan tingkat kejenuhan S_2 % sebanyak 1 liter dari larutan S_1 % berdasarkan rumus $g = 533(S_2 - S_1) / 100 - 0,3S_2$. Penambahan garam dilakukan sedikit demi sedikit pada suhu 0-5° C sambil diaduk dengan pengaduk magnetik selama 2 jam. Larutan selanjutnya dibiarkan mengendap semalaman. Endapan selanjutnya dipisahkan melalui sentrifugasi pada putaran 7500 rpm dengan suhu 4° C selama 70 menit. Endapan yang diperoleh kemudian disuspensikan dalam buffer borat 0,2 M pH 9,0.

Selanjutnya setiap fraksi enzim yang diperoleh ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya menggunakan prosedur yang sama seperti pada enzim kasar.

Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan membran selofan yang sudah dibersihkan dari pengotor gliserin dan senyawa sulfur. Pengotor gliserin dibersihkan dengan cara mencuci menggunakan aliran air selama 4 jam. Sedangkan pengotor sulfur dihilangkan dengan cara memasukkan selofan ke dalam larutan 0,3 % Na_2S pada suhu 80° C selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air panas 60° C selama 2 menit dan pengasaman dengan 0,2 % (v/v) H_2SO_4 . Selanjutnya dicuci dengan air panas untuk menghilangkan asamnya.

Suspensi enzim dimasukkan ke dalam kantung selofan, lantas dicelupkan dalam buffer borat

0,2 M pH 9,0. Proses dialisis dilakukan pada suhu dingin menggunakan *ice salt bath*, selama 24 jam dengan penggantian larutan buffer sebanyak 8 kali.

Kromatografi Penukar Anion DEAE-Selulosa

Kolom DEAE-Selulosa yang digunakan mempunyai panjang 33 cm, diameter 1,7 cm dengan volume 27,22 cm³. Kolom yang telah diregenerasi dengan larutan NaCl 1,4 M sebanyak 10 kali volume kolom untuk menghilangkan sisa protein yang tertinggal dalam kolom. Kolom kemudian dikondisikan dengan pelarut NaCl 0,02 M sebanyak 10 kali volume. Selanjutnya sejumlah 1,5 ml sampel dituangkan secara perlahan ke kolom melalui dinding tabung menggunakan pipet dan dibiarkan semalaman agar protein sampel berinteraksi dengan gugus amino dari resin yang bermuatan positif. Sampel kemudian dielusi menggunakan eluen NaCl 0,02 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,4 M dan 0,5 M dengan laju alir 58 cpm. Tiap fraksi dengan volume 2,5 ml ditampung dengan bantuan pengumpul fraksi (*fraction collector*). Total fraksi yang diperoleh sebanyak 48 fraksi.

Kandungan protein tiap fraksi ditentukan berdasarkan ekstrapolasi dengan standard BSA 0,001-0,7 mg/ml yang diukur serapannya pada λ 280 nm. Selanjutnya fraksi dengan kadar protein tertinggi diukur aktivitas spesifiknya.

Penentuan kondisi optimal reaksi.

pH optimum, ditentukan berdasarkan prosedur 2.2.2, dengan variasi pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 menggunakan buffer borat 0,2 M.

Suhu optimum ditentukan berdasarkan variasi suhu inkubasi pada 10, 20, 30, 40 dan 50° C menggunakan kondisi pH optimum yang diperoleh sebelumnya.

3. Hasil dan Pembahasan

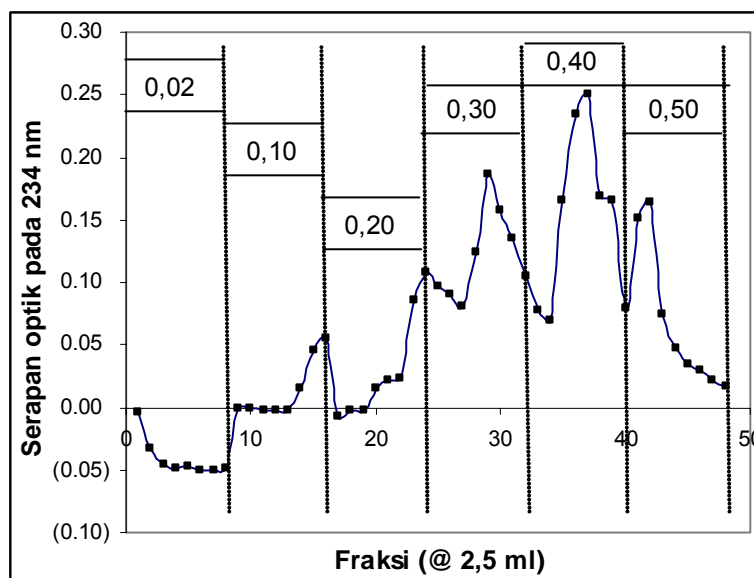
Isolasi dan Fraksinasi

Isolasi lipoksigenase dilakukan secara ekstraksi menghasilkan supernatan ekstraks enzim kasar sebanyak 367,13 mg protein dalam 445 ml volume dengan aktivitas spesifik 0,0226 U/mg.

Fraksinasi enzim kasar dilakukan melalui proses salting out dengan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Anion sulfat merupakan anion divalent yang efektif untuk mengendapkan protein. Garam ini mempunyai kelarutan yang baik pada suhu rendah dan bersifat endotermik sehingga

Tabel 1. Aktivitas spesifik lipoksigenase dari setiap tahap pemurnian

Tahap Isolasi	Volume (ml)	Kadar Protein (mg/ml)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Pemurnian (fold, kali)
Ekstraksi	445	0,825	367,130	0,226	1,00
Salting out 0-30 % (NH ₄) ₂ SO ₄	483	0,519	250,677	0,172	
Salting out 30-60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	203	0,597	121,191	0,182	
Salting out 60-90 % (NH ₄) ₂ SO ₄	135	0,314	42,35	0,418	1,85
Dialisis	63	0,377	23,76	0,523	2,31
DEAE Selulosa (puncak 1)	2,5	0,085	0,213	22,433	99,26
DEAE Selulosa (puncak 2)	2,5	0,017	0,043	350,588	1550,59
DEAE Selulosa (puncak 3)	2,5	0,130	0,325	40,308	178,35



Gambar 1. Kromatogram DEAE selulosa protein isolat lipoksigenase dengan eluen NaCl

mengurangi kemungkinan denaturasi protein selama proses fraksinasi. Berdasarkan tingkat kejenuhan larutan garam yang digunakan, diperoleh tiga suspensi enzim. Suspensi enzim yang diperoleh dengan tingkat kejenuhan garam 0-30 % mengandung 250,68 mg protein dengan aktivitas spesifik 0,172 U/mg. Suspensi enzim yang diperoleh dengan tingkat kejenuhan garam 30-60 % mengandung 121,19 mg protein dengan aktivitas spesifik 0,182 U/mg. Sedangkan suspensi enzim yang diperoleh dengan tingkat kejenuhan garam 60-90 % mengandung 42,35 mg protein dengan aktivitas spesifik 0,418 U/mg. Terlihat suspensi enzim ke-tiga mempunyai aktivitas spesifik tertinggi, hal tersebut menunjukkan bahwa lipoksigenase banyak terdapat pada fraksi ini.

Resume aktivitas spesifik enzim kasar dan setelah proses salting out dengan garam ammonium sulfat ditampilkan pada Tabel 1.

Dialisis

Dialisis dilakukan dengan menggunakan buffer borat 0,2 M pH 9,0 untuk mengurangi residu garam (NH₄)₂SO₄ pada suspensi enzim. Kelebihan (NH₄)₂SO₄ dalam suspensi enzim akan mengganggu proses pemisahan dengan kromatografi selanjutnya. Suspensi enzim yang diperoleh setelah dialisis mengandung 23,76 mg protein dengan aktivitas spesifik 0,523 U/mg. Terlihat bahwa proses dialisis meningkatkan aktivitas spesifik enzim sebanyak 1,25 kali dari proses isolasi sebelumnya seperti terlihat pada Tabel 1.

Kromatografi penukar anion DEAE selulosa

Prinsip pemurnian enzim dengan kromatografi penukar anion DEAE selulosa adalah protein bermuatan negatif akan berikatan dengan gugus amino DEAE selulosa yang bermuatan positif, sedangkan protein sampel bermuatan positif akan keluar. Ikatan antara DEAE selulosa

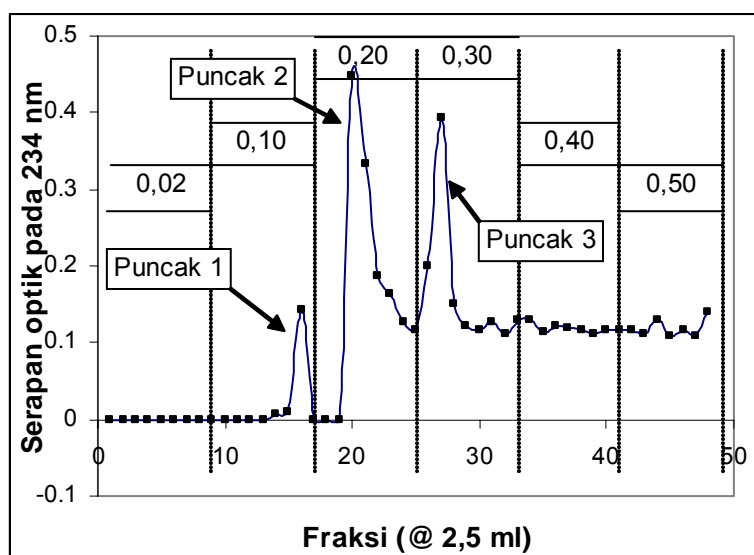
dengan protein enzim dilepas melalui penukaran anion dengan cara menambahkan berbagai variasi konsentrasi NaCl sebagai eluen. Profil elusi protein ditampilkan pada Gambar 1.

Peningkatan konsentrasi eluen NaCl menyebabkan penukaran anion semakin efektif yang ditunjukkan dengan peningkatan serapan protein pada fraksi hasil elusi dengan konsentrasi NaCl antara 0,2 – 0,4 M NaCl. Peningkatan konsentrasi NaCl lebih lanjut menjadi 0,5 M tidak meningkatkan serapan protein lagi, hal ini menunjukkan bahwa protein dalam sampel sudah terelusi semua.

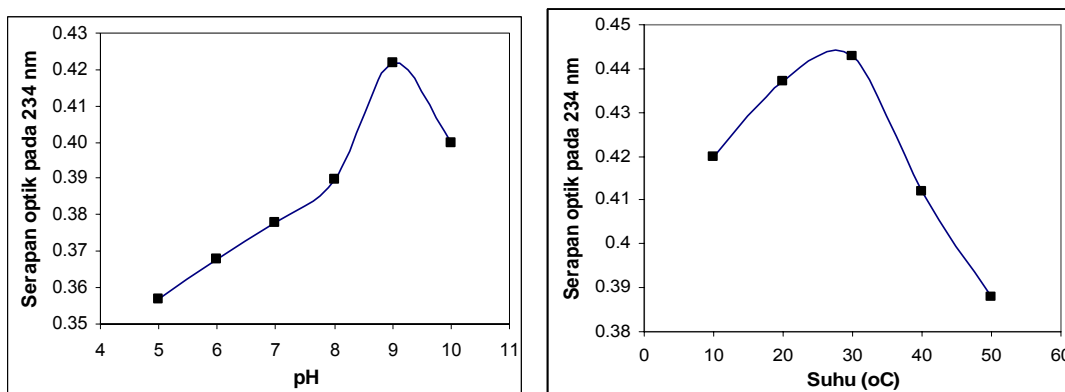
Tiap fraksi hasil kromatografi penukar anion selanjutnya diukur aktivitasnya menghasilkan

kurva seperti pada Gambar 2. Terlihat bahwa aktivitas lipoksidase muncul pada puncak pertama ke-dua dan ke-tiga. Puncak ke-1 mengandung 0,2125 mg protein dengan aktivitas spesifik 22,433 U/mg. Puncak ke-2 mengandung 0,0425 mg protein dengan aktivitas spesifik 350,588 U/mg. Sedangkan puncak ke-3 mengandung 0,325 mg protein dengan aktivitas spesifik 40,408 U/mg.

Puncak ke-2 menunjukkan bahwa walaupun protein yang dikandungnya paling sedikit tetapi memberikan aktivitas spesifik paling tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa kemurnian enzim pada fraksi ini paling tinggi. Sedangkan puncak ke-empat dengan kandungan protein paling banyak ternyata tidak mengandung



Gambar 2. Aktivitas lipoksidase yang terdapat pada tiap fraksi protein



Gambar 3. Hubungan antara aktivitas enzimatis dengan variasi pH (a) dan variasi suhu (b). Kondisi optimum reaksi oksidasi asam linoleat yang dikatalisis oleh lipoksidase hasil isolasi diperoleh pada pH 9,0 dan suhu 30° C..

lipoksigenase.

Peningkatan kemurnian dari produk dialisis berturut-turut adalah sebanyak 42,99; 671,25 dan 77,21 kali atau tingkat pemurnian dari ekstrak kasar sebanyak 99,26; 1550,59 dan 178,35 kali, Tabel 1.

Penentuan Kondisi Optimum Reaksi

Kondisi optimum, pH dan suhu, reaksi oksidasi asam linoleat yang dikatalisis lipoksigenase hasil isolasi ditampilkan pada Gambar 3.

Kondisi optimum ditentukan pada pH 5-10. Hubungan antara aktivitas enzimatis yang dinyatakan dengan serapan optik pada 234 nm dengan variasi pH menunjukkan optimum pada pH 9, seperti terlihat pada Gambar 3a. Sedangkan penentuan suhu inkubasi optimum dilakukan dengan bervariasi suhu antara 10-50° C, diperoleh suhu optimum pada 30° C seperti terlihat pada Gambar 3b.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa :

- lipoksigenase terdapat pada biji kacang panjang (*Vigna sesquipedalis*)
- isolasi secara bertahap meningkatkan kandungan lipoksigenase dalam isolat, kemurnian isolat tertinggi diperoleh dari hasil kromatografi penukar anion DEAE selulosa dengan peningkatan kemurnian sebesar 1550,59 kali.
- kandungan protein yang tinggi pada isolat tidak berarti juga mempunyai kandungan lipoksigenase yang tinggi
- kondisi optimum reaksi diperoleh pada pH 9,0 dan 30° C. Ini menunjukkan bahwa

lipoksigenase yang diperoleh adalah tipe I (LOX-1)

5. Daftar Pustaka

Boyington, J.C., Gaffney, B.J., and Amzel, L.M. 1993. The three dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260, 1482-1486.

Chen, X.S., Seller, Jr., Johnson, E.N. and Funk, C.D. 1994. Role of leucotrienes revealed by targeted disruption of 5-lipoxygenase gene. *Nature*, 10, 372 (6502), 179-182.

Clark, W.R. (1991). *The experimental foundation of modern immunology*. John Wiley & Sons, Canada.

DKFZ. 2003. Lipoxygenase data base. 2 hlm. <http://www.dkfz-heidelberg.de/spec.lox-db.html>. 1 juni 2003. pk. 18.00.

Dwyer, J.H., Allayee, H., Dwyer, K.M., Fan, J., Wu, H., Mar, R., Lusic, A.J., and Mehrabian, M. 2004. Arachidonat 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and arterosclerosis. *N. Eng. J. of Med.*, v. 35 (1), 29-37.

Kwiterovitch Jr., P.O. (1993). *The John Hopkins complet guide for preventing and reversing heart desease*. Prima Publishing, Kalifornia.

Rao, A.V.S.S.R, Suryalaksmi, A. (1995). *A textbook of biochemistry for medical student*. USB Publishers Distributors, India.

Riana, A. (2000). Nilai nutrisi kacang panjang. 2 hlm. <http://www.asiamaya.com/nutrients/kacangpanjang.html>. 18 Januari 2003, pk. 20.30.

Ross, R. 1999. Artherosclerosis : an imflatory deseases. *N. Eng. J. of Med.*, v.340, 115-126.

William, M and Harwood, J.L. 2000. Characterization of lipoxygenase isoform in olive callus cultures. *Biochemical Society Transaction*, 28 : 830-831.

Studi Pendahuluan Analisis Kandungan Senyawa Ganoderma Polisakarida/GPS Sebagai Prebiotik Pada Jamur Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

Susilowati Hadisusilo.¹, Erlin Nurtiyani², Yepy Hardi R.¹

1) Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia
Kampus UI- Depok, Jakarta 16424, Indonesia
e-mail: susiwati@makara.cso.ui.ac.id

2) Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia
Kampus UI – Depok, Jakarta 16424, Indonesia

Abstrak

Jamur Lingzhi (Ganoderma lucidum) kaya akan senyawa aktif organik seperti polisakarida, asam amino, protein, triterpen, alkaloid dan lain-lain. Salah satu kandungan Lingzhi yang memberikan manfaat untuk kesehatan adalah Ganoderma polisakarida (GPS), yang merupakan senyawa prebiotik. Dalam penelitian ini dilakukan studi pendahuluan analisis kandungan GPS pada jamur Lingzhi. GPS adalah heteropolisakarida yang terdiri atas maltosa, galaktosa dan monosakarida lain dalam jumlah sedikit, ditambah asam-asam amino yang terkonyugasi seperti asam aspartat dan asam glutamat. Hasil analisis dengan tes Molish positif, analisis spektroskopi inframerah dapat dideteksi adanya gugus fungsi O-H, CHO dan C-H. Analisis kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair kinerja tinggi dapat terdeteksi adanya glukosa, galaktosa dan manosa. Hasil analisis gravimetri memberikan kadar fraksi polisakarida dalam sampel jamur Lingzhi yaitu 0,66 % dan analisis Follin Wu memberikan kandungan gula pereduksi dalam fraksi polisakarida sebesar 24,62%.

Kata kunci: GPS, jamur Lingzhi, prebiotik

1. Pendahuluan

Jamur Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) atau dikenal dengan nama Jepang “Reishi”, sudah dikenal di Cina sejak 4000 tahun yang lalu dan dipercaya dapat meningkatkan stamina serta memperpanjang umur. Sifat utama Lingzhi adalah kemampuannya dalam pembersihan darah, meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan aktivitas antitumor (Takashi *et al.*, 1999) Kandungan senyawa kimia aktif dalam jamur Lingzhi bervariasi tergantung pada spesies, asal, teknik pembiakan dan tingkat pertumbuhannya. Namun pada dasarnya Lingzhi mengandung gula-gula pereduksi, polisakarida, asam karboksilat, triterpenoid, germanium organik, asam amino, protein, sterol, alkaloid dan lain-lain (Mamoru *et al.*, 1997). Metode pembiakan Lingzhi dikenal dengan metode Mikei, yaitu dengan mencangkokkan jamur induk pada batang kayu kemudian ditempatkan dalam rumah kaca

dengan kondisi ruangan yang terjaga. Setelah pemanenan, jamur dikeringkan selama 3-4 jam pada suhu 80°C sehingga diperoleh Lingzhi kering yang dapat diolah menjadi berbagai bentuk obat.

Senyawa prebiotik adalah merupakan senyawa kelompok oligosakarida serta beberapa jenis peptida yang sukar dicerna sehingga dapat mencapai usus dan merupakan nutrisi yang sesuai bagi bakteri baik (probiotik) dalam saluran pencernaan. Secara alami senyawa prebiotik banyak terdapat pada biji-bijian, sayuran, buah-buahan, akar-akaran tanaman dan sebagainya.

Salah satu kandungan Lingzhi yang memberikan manfaat bagi kesehatan adalah *Ganoderma* polisakarida (GPS). GPS adalah heteropolisakarida yang terdiri dari maltosa, galaktosa dan monosakarida lain yang terkonyugasi dengan asam-asam amino seperti

asam aspartat dan asam glutamat, untuk itu dalam penelitian ini dilakukan studi pendahuluan analisis kandungan GPS.

Foto Jamur Lingzhi



Sumber: www.namrex.com dan www.caitied.com

Gambar 1. Jamur Lingzhi

2 Percobaan

2.1. Persiapan sampel (Mamoru *et al.* 1997)

Jamur Lingzhi kering 250 g setelah dibersihkan, diekstrak dalam air panas (95-100°C) selama 30 jam. Filtrat disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Aliquot kemudian diendapkan dengan etanol kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8500 rpm selama 20 menit. Endapan dipisahkan kemudian dilarutkan kembali dalam air (100mL), kemudian didialisis. Hasil dialisis diendapkan kembali dengan etanol, kemudian disentrifugasi kembali. Endapan hasil sentrifugasi dipisahkan, dikeringkan pada suhu 40°C, hasilnya merupakan sampel yang diduga mengandung senyawa Ganoderma Polisakarida (GPS)

2.2. Analisis Kulitatif Ganoderma Polisakarida (GPS)

2.2.1. Tes Molish

Ke dalam 2mL larutan sampel fraksi GPS yang telah dihidrolisis sebelumnya oleh HCl 6N, ditambahkan 2 tetes larutan Molish dan 1mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung.

2.2.2. Analisis Spektroskopi Inframerah (IR)

Sampel yang telah dihaluskan bersama KBr dengan perbandingan 1:100, dimasukkan dalam sel sampel. Setelah alat spektrofotometer dikalibrasi, dilakukan analisis hingga diperoleh spectrum sampel, dan dibandingkan dengan spektra gugus fungsi standar dari reference.

2.2.3. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel fraksi GPS yang telah dihidrolisis dengan HCl 6N pada suhu 60°C selama 30menit, kemudian dikeringkan dalam oven suhu 60°C. Padatan kering dan standar beberapa monosakarida dilarutkan dalam aquadest kemudian dibuat spot pada lempeng silika yang telah diimpregnasi dengan larutan natrium asetat 0,02M. Pemisahan dilakukan dalam bak pengembang dengan fasa gerak campuran n-propanol dan aquades (85:15) hingga terjadi pemisahan.

2.2.4. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Sampel yang telah dihidrolisis, dilarutkan dalam aquades kemudian diinjeksikan ke dalam alat KCKT. Pemisahan dilakukan dengan fase gerak methanol-air (60-40) menggunakan kolom amina fase terikat pada suhu 30°C, kecepatan alir fase gerak diatur pada 1mL/menit dengan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 254nm.

2.3. Analisis Kuantitatif Ganoderma Polisakarida (GPS)

2.3.1. Analisis Gravimetri

Fraksi GPS yang sudah dikeringkan ditimbang dan dibandingkan dengan berat kering sampel awal untuk menentukan kadarnya.

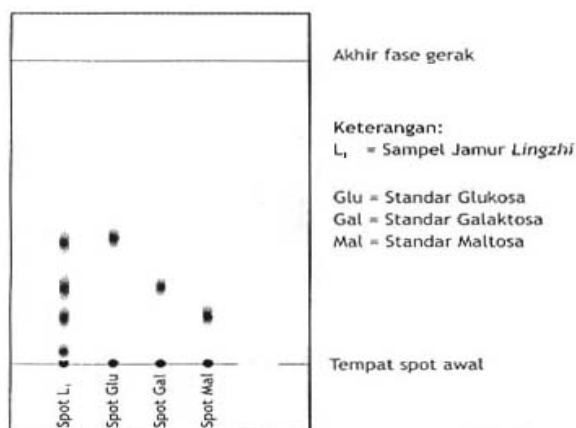
2.3.2. Analisis Kandungan Gula Pereduksi Metode Folin Wu

Larutan sampel adalah sampel fraksi GPS yang sudah dihidrolisis dengan HCl 6N dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit, dipipet sebanyak 0,4mL ke dalam tabung Folin Wu yang sudah berisi 4mL Na₂CO₃ 0,25 N dan ditambahkan 5,6mL aquadest.

Larutan standar glukosa dengan konsentrasi 20ppm, 40ppm, 75ppm, dan 100ppm juga diperlakukan seperti sampel. Semua tabung Folin Wu dipanaskan dalam air mendidih selama 8 menit. Kemudian ditambahkan 2mL larutan asam fosfomolibdat, kemudian larutan ditepatkan sampai 25mL. Dikocok sampai homogen dan diukur dengan spektrofotometer visible pada panjang gelombang maksimum ; dibuat kurva kalibrasi standar dan dapat ditentukan kandungan gula pereduksi dalam fraksi GPS.

3. Hasil dan Pembahasan

Analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan melakukan pendekatan-pendekatan



Gambar 2 : Hasil pemisahan monosakarida penyusun GPS dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada lempeng silica yang diimpregnasi oleh natrium asetat 0,02 M dan menggunakan fase gerak n-propanol : aquadest (85:15)

Tabel 1. Data R_f dan kesimpulan dugaan hasil pemisahan monosakarida penyusun GPS dengan KLT pada lempeng silica, diimpregnasi natrium asetat 0,02 M, fase gerak n-propanol : aquades (85:15)

Spot	R_f	Kesimpulan / Dugaan
Standar glukosa	0,41	
Standar galaktosa	0,25	
Standar maltosa	0,16	
Sampel jamur Lingzhi:	0,43	Glukosa
	0,25	Galaktosa
	0,16	Maltosa

sehingga kita dapat menduga bahwa fraksi polisakarida yang kita peroleh adalah Ganoderma Polisakarida (GPS) yang dikenal memiliki khasiat bagi kesehatan, dan diduga berfungsi sebagai senyawa prebiotik.

Hasil tes Molish memperlihatkan hasil yang positif dengan terbentuknya warna ungu, hal ini menunjukkan bahwa fraksi polisakarida dalam jamur Lingzhi termasuk dalam kelompok senyawa polisakarida.

Analisis kromatografi lapis tipis, dilakukan untuk mengetahui jenis monosakarida penyusun dalam fraksi polisakarida. Hasil analisis didapat nilai R_f yang dibandingkan dengan standar. Didapatkan beberapa spot dan dapat disimpulkan $R_f = 0,43$, $R_f = 0,25$ dan $R_f = 0,16$ berturut-turut sebagai glukosa, galaktosa dan maltosa.

Analisis spektrum infra merah juga memperkuat dugaan bahwa fraksi yang kita peroleh adalah polisakarida. Hasil hidrolisis polisakarida yang dianalisis spectrum

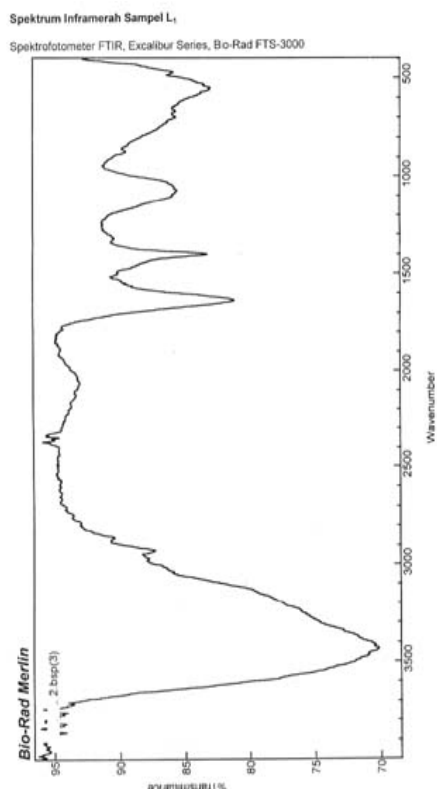
inframerah, diperoleh puncak-puncak spectrum yang menunjukkan gugus-gugus fungsi GPS.

Gugus O-H pada bilangan gelombang antara $3460 - 3470 \text{ cm}^{-1}$, gugus aldehyd pada bilangan gelombang sekitar 1636 cm^{-1} dan gugus C-H pada bilangan gelombang antara $1400 - 1405 \text{ cm}^{-1}$.

Hasil pemisahan dengan kromatografi cair kinerja tinggi, nilai *Retention time* 3,57 ; 4,71 dan 5,57 menit, berturut-turut adalah glukosa, galaktosa dan maltosa. Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa fraksi polisakarida dari jamur Lingzhi mengandung / tersusun di antaranya adalah glukosa, galaktosa dan maltosa.

Dari analisis kuantitatif secara gravimetrik didapatkan bahwa jamur Lingzhi mengandung 0,66% (w/w) fraksi polisakarida.

Penentuan kadar gula pereduksi dalam fraksi polisakarida dengan metode Folin Wu, diukur menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang (λ) 790 nm.



Gambar 3: Spektrum Inframerah sampel

Setelah dibuat kurva standar, didapat kadar gula pereduksi sampel adalah 24,62 %

4. Kesimpulan

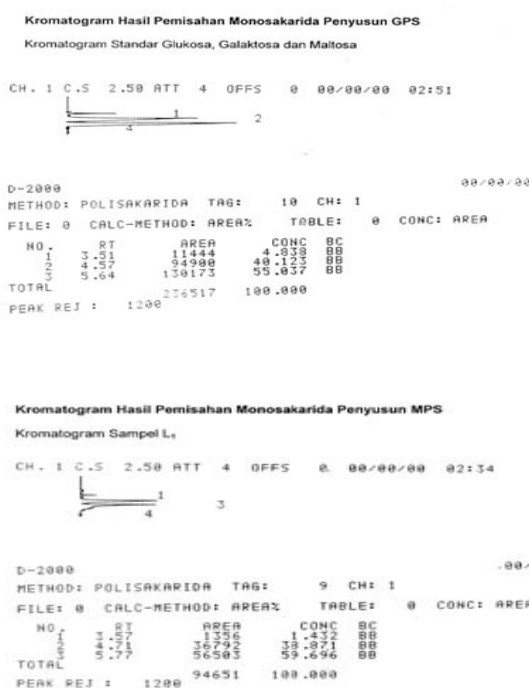
Senyawa hasil ekstraksi jamur *Lingzhi* yang kemudian diendapkan etanol, merupakan *Ganoderma Polissakasida* (GPS). Dari hasil data analisis kualitatif dan kuantitatif, hasil hidrolisis GPS merupakan senyawa-senyawa monosakarida yang merupakan hidrolisis dari oligosakarida yang diduga sebagai senyawa prebiotik.

5. Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih kepada PT. Botani Tropical Lestari, yang telah membantu memberikan sampel jamur *Lingzhi* untuk penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

Alexander Renee R., Griffiths Joan M., 1993, *Basic Biochemical Method*, 2nd edition, Wiley-Liss Inc., New York



Gambar 4: Kromatogram standar dan kromatogram sampel (hasil pemisahan monosakarida penyusun GPS)

Ito Hitoshi, 1998, *What is Reishi?*, Network Global Publishing: <http://www.canited.com/>, 24 Agustus 2001, 10.57 WIB

Mizuno Takashi, Wang Guanying, Zhang Jie, Kawagishi Hirokazu, Nishitoba Tsuyoshi, Li Jingxuan, 1999, *Reishi, Ganoderma Lucidum and Ganoderma Tsuage : Bioactive Substances and Medical Effects*, <http://www.mikei.com/reishi1997-6.htm>, Japan : Japan's MIKEI corp., 24 Agustus 2001, 11.20 WIB

Sugiura Mamoru, Ito Hioshi, 1997, *Study of the Main Chemical Component of Ganoderma lucidum*, <http://www.reishi.com/ganolucd.html>, 24 Agustus 2001, jam 17.30 WIB

Vita Green Health Products Co.,Ltd., "Five Coloured" *Lingzhi (Ganoderma lucidum)*, *Clinical Aspect*, <http://www.vitagreen.com/html/lingzhi.htm>, 24 Agustus 2001, 17.00 WIB.

Sintesis 1,3-Dihidroksi-2-(4-Piridil)-4,5-Dimetil Imidazolina sebagai Prekursor Senyawa Organik Radikal 2-(4-Piridil)-4,5-Dimetil Imidazolina-1-Oksil-3-Oksida

Sutrisno, I Wayan Dasna, Parlan

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang
Jl. Surabaya 6 Malang 65145 Telp./Fax. 0341 – 567382
e-mail: tris_shanta@telkom.net

Abstrak

Telah dilakukan usaha untuk mensintesis suatu senyawa 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetil imidazolina sebagai prekursor senyawa organik radikal 2-(4-piridil)-4,5-dimetil imidazolina-1-oksil-3-oksida. Senyawa ini merupakan turunan dari 2-(4-piridil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oksil-3-oksida (**RadDPyTIm**) yang telah berhasil disintesis dan telah dikembangkan sebagai ligan nitronil nitroksida. Tujuan penelitian ini adalah mensintesis 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetil imidazolina, yakni mengurangi gugus metil imidazol dalam RadDPyTIm. Langkah-langkah sintesis yang dilakukan adalah: (1) reaksi kopleng oksidatif nitroetana menjadi 2,3-dinitrobutana, (2) reduksi 2,3-dinitrobutana (hasil langkah 1) membentuk 2,3-dihidroksilaminobutana, dan (3) reaksi 2,3-dihidroksilaminobutana (hasil langkah 2) dengan 4-piridinkarboksaldehida membentuk 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetil imidazolina. Karakterisasi zat hasil penelitian dilakukan berdasar titik lebur dan kelarutan dan diidentifikasi melalui spektroskopi ultraviolet, inframerah, dan ¹H-NMR. Hasil penelitian telah diperoleh beberapa senyawa, yakni: (1) 2,3-dinitrobutana (suatu zat padat kristal berwarna kuning coklat), (2) 2,3-dihidroksilaminobutana (tidak diidentifikasi), dan (3) 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-imidazolina.

Kata-kata kunci: 2,3-dihidroksilaminobutana, 2,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetil imidazolina

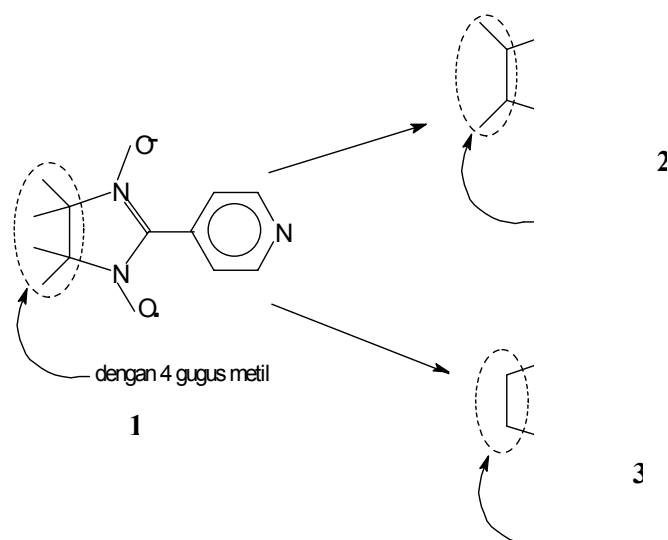
1. Pendahuluan

Material magnetik merupakan suatu material yang secara molekuler bersifat magnetik. Sifat ini disebabkan oleh interaksi elektron-elektron tidak berpasangan dalam molekulnya. Penelitian mutakhir tentang material magnetik terus berlanjut guna menemukan bahan baru sebagai sumber energi, superkonduktor, dan katalis [1]. Sifat-sifat mikroskopis pada tingkat molekuler berinteraksi untuk menghasilkan sifat makroskopik (*tampak pada bahan*) yang sama dengan sifat-sifat molekulernya. Karena sifat bahan ditentukan oleh sifat molekulernya, maka dalam sintesis suatu dengan sifat-sifat yang tertentu dapat direkayasa dari spesies-spesies penyusunnya.

Beberapa strategi sintesis senyawa magnetik telah dikembangkan. Sedikitnya terdapat lima strategi yang telah dikembangkan, yaitu (1) ortogonalitas orbital, (2) non kompensasi spin,

(3) magnet molekul organik, (4) stabilisasi keadaan triplet, dan (5) senyawa kombinasi. Strategi senyawa kombinasi pada dasarnya merupakan sintesis senyawa kompleks dari ion logam transisi paramagnetik dengan suatu ligan paramagnetik. Ligan tersebut umumnya adalah senyawa organik radikal. Senyawa yang diperoleh digunakan sebagai prekursor untuk dikombinasikan dengan suatu ligan berjembatan guna memperoleh interaksi intermolekuler [2].

Senyawa kompleks mangan(II) dengan ligan radikal 2-(4-piridil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oksil-3-oksida (RadDPyTIm) dan *disianamida* sebagai usaha untuk memperoleh material magnetik telah berhasil disintesis, namun mempunyai temperatur kritik, T_c yang rendah [2]. Studi kristalografi terhadap RadDPyTIm menunjukkan interaksi



Gambar 1. Skema reduksi jumlah gugus metil padacincin imidazol

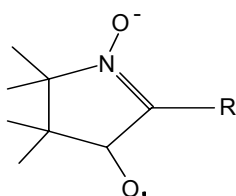
intermolekulernya relatif masih rendah ($\sim 3,656\text{\AA}$). Keadaan tersebut diduga akibat efek sterik yang besar dari RadDPyTIm akibat empat gugus metil pada cincin imidazolinyanya (Gambar 1).

Senyawa ini sebelumnya telah dikenal penggunaannya secara luas dalam sistem biologi yakni sebagai *spin-probe*, tetapi akhir-akhir ini digunakan sebagai ligan paramagnetik. Sintesis ligan ini telah dilaporkan oleh Ullman [6,7] dan juga oleh Dasna [2]. Senyawa ini merupakan senyawa organik yang stabil pada temperatur kamar dan mempunyai sifat paramagnetik sebagai akibat adanya satu elektron tidak berpasangan pada gugus N–O. Terdapatnya empat gugus metil pada cincin imidazolina memerlukan volume ruang yang besar sehingga interaksi antar molekul yang bertetangga menjadi lemah. Agar interaksi intermolekuler meningkat dilakukan penurunan efek sterik dari radikal akibat gugus metil tersebut. Hal ini dapat dilakukan misalnya melalui sintesis senyawa baru radikal 2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina-1-oksil-3-oksida, selanjutnya disingkat Rad(DPyDIIm). Senyawa radikal ini mempunyai dua buah gugus metil pada cincin imidazolinyanya, sehingga diduga akan mempunyai efek sterik yang lebih rendah dibanding RadDPyTIm yang mempunyai empat gugus metil. Skema penurunan efek sterik ligan radikal

nitronilnitrosida (Gambar 1), yakni ligan RadDPyTIm, **1** (dengan empat gugus metil pada bagian cincin imidazolina) menjadi dengan dua gugus metil pada cincin imidazolina (RadDPyDIIm), **2**, atau tanpa gugus metil dalam cincin imidazol (RadDPyIm), **3**.

Sintesis senyawa kompleks sebagai material ferromagnetik maupun anti-ferromagnetik dengan salah satu ligannya RadDPyTIm telah dilakukan oleh para ahli, antara lain Caneschi, dkk. [8], Oshio, dkk.[9] namun mempunyai T_c yang rendah, tertinggi hanya mencapai 10K. Dasna, dkk. [3-4, 10-11] telah melakukan penelitian untuk meningkatkan T_c material magnetik dengan strategi peningkatan dimensi struktur senyawa melalui polimerisasi grup (*group polymerisation*) logam-radikal dengan ligan-ligan diamagnetik disianamida, hasilnya adalah senyawa yang bersifat ferromagnetik dengan T_c sekitar 50K dan interaksi spin intramolekulernya (J) berkisar $1,64\text{--}5,2\text{ cm}^{-1}$. Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa polimerisasi grup logam-radikal menghasilkan senyawa dengan struktur 0-D (struktur terisolasi) sampai 2-D dengan T_c lebih tinggi dari senyawa logam-radikal (M-radikal) yang telah disintesis sebelumnya. Walaupun hasil yang diperoleh mempunyai struktur molekul yang sangat menarik, namun sifat magnetik senyawa-senyawa tersebut belum memuaskan karena masih rendahnya T_c yang diperoleh.

Oleh sebab itu, penelitian untuk meningkatkan T_c dari strategi ini masih perlu untuk terus dikembangkan. Ligan RadDPyTIm tersebut dikenal sebagai senyawa radikal nitronilnitrosida dengan struktur umum seperti pada 4.



(4)

RadDPyTIm diperoleh dengan menggunakan piridin-4-karboksaldehida sebagai -R. Senyawa ini bersifat paramagnetik dan dapat membentuk senyawa kompleks dengan ion-ion logam [2-4]. Kajian struktur RadDPyTIm menunjukkan interaksi antar molekul yang lemah ($J = 3,2 \pm 0,08 \text{ cm}^{-1}$, $zJ = -0,32 \text{ cm}^{-1}$ untuk $M = \text{Mn(II)}$, [3]). Interaksi antar molekul yang lemah tersebut diduga karena adanya efek sterik yang besar dari dua radikal yang berseberangan. Untuk mensintesis 1 bahan dasar yang digunakan 2-nitropropana, maka sintesis 3 akan dapat diperoleh dari 1,2-dinitroetana. Secara teori 1,2-dinitroetana ini dapat disintesis melalui reaksi kopling nitrometana di bawah tahapan brominasi dalam suasana basa dalam pelarut etanol-air. 1,2-Dinitroetana kemudian dikonversi menjadi 1,2-bis-(hidroksilamino)etana untuk dikondensasikan lanjut dengan aldehida. Pada tahap ini diperlukan katalis seng dan biasanya berlangsung pada temperatur $< 10^\circ\text{C}$. Senyawa yang diperoleh kemudian dioksidasi oleh natriumperiodat untuk memperoleh senyawa radikal.

Perolehan senyawa baru radikal RadDPyIm dapat digunakan untuk membuat senyawa kompleks yang berpotensi sebagai material magnetik dengan sifat-sifat magnetik lebih unggul. Sintesis senyawa tersebut sangat penting untuk mengetahui pengaruh sterik ligan radikal terhadap interaksi magnetik intermolekuler dalam material magnetik senyawa kompleks. Aspek penelitian yang dilakukan adalah sintesis 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina (DPyDIm) sebagai prekursor senyawa radikal 2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina-1-oksil-3-oksid

(Rad DPyDIm). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh senyawa baru DPyDIm sebagai prekursor senyawa RadDPyDIm. Senyawa radikal tersebut akan digunakan sebagai ligan paramagnetik dalam sintesis material magnetik baru berbasis senyawa kompleks. Senyawa DPyIm diperoleh melalui sintesis dengan bahan dasar nitrometana dan 4-piridil-karboksaldehida.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Semua data dikumpulkan dan diperoleh dari hasil pengamatan di laboratorium. Sasaran penelitian adalah diperolehnya 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina sebagai prekursor ligan radikal yakni 2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina-1-oksil-3-oksid dengan tahapannya meliputi: (1) sintesis 2,3-dinitrobutana, (2) sintesis 2,3-dihidroksiaminobutana, dan (3) sintesis, pemurnian, karakterisasi, dan identifikasi 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina. Karakterisasi senyawa hasil sintesis dilakukan dengan penentuan titik leleh dan uji kelarutan. Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis dengan metode spektroskopi ultraviolet (UV), inframerah (IR), dan resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$).

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain nitroetana, 4-piridinkarboksaldehida, natriumhidroksida, brom, seng, ammonium klorida, etanol, aquades, metanol, dietil eter, diklorometana, aseton, metil klorida, aluminium foil, pipa kapiler, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilsulfoksida terdeuterasi (d_6). Derajat kualitas bahan adalah *for synthesis, pro-analysis*, atau yang sejenisnya. Semua bahan langsung digunakan tanpa perlakuan khusus.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, beaker glass, erlenmeyer, seperangkat alat refluks, labu leher tiga, desikator, pipet volume, gelas ukur, *rovavapor*, corong *Buchner*, termometer, *ultrasonic cleaner*, thermos air, *magnetic stirrer*, spatula, *Melting Point Apparatus*: SIBATA Mel-270, spektrofotometer UV: SHIMADZU UV-1610, spektrofotometer IR: Jasco FT/IR-5300 dan spektrofotometer $^1\text{H-NMR}$: HITACHI FT/NMR-R-1900.

Analisis Data

Data yang telah teridentifikasi selanjutnya dianalisis untuk menentukan dan mengkaji zat-zat hasil sintesis. Wujud, bentuk dan warna zat digunakan untuk menentukan sifat fisik senyawa hasil sintesis. Titik lebur dan kromatogram dianalisis untuk menentukan kemurnian senyawa-senyawa hasil sintesis. Analisis spektrum UV, IR, dan ¹H-NMR untuk menetapkan struktur senyawa hasil sintesis.

3. Percobaan, Hasil dan Pembahasan

Sintesis 2,3-Dinitrobutana

Sintesis 2,3-dinitrobutana dilakukan dengan cara mereaksikan tetes demi tetes 0,25 mol natrium hidroksida dengan 0,25 mol nitroetana pada labu leher tiga 500 mL, yang diletakkan di dalam penangas es yang dilengkapi dengan pengaduk magnetik. Penambahan natrium hidroksida ke dalam labu leher tiga dilakukan selama 3-4 jam, suhu larutan dijaga pada ± 10°C. Setelah penambahan NaOH selesai pengadukan dilanjutkan hingga satu jam. Kemudian ditambahkan 0,125 mol Br₂ sedikit demi sedikit selama satu jam dan suhu larutan

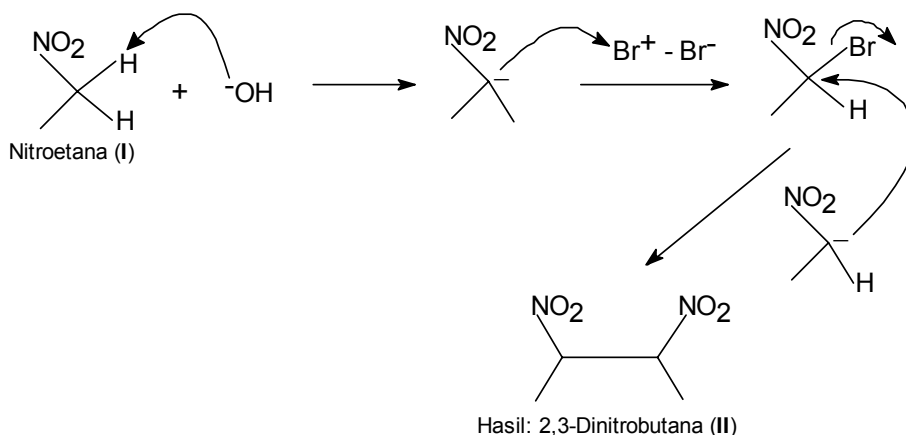
dijaga tetap 0°C. Selanjutnya larutan ditambah dengan 50 mL etanol dan direfluks di atas penangas minyak selama kurang lebih satu jam. Hasil pengamatan terangkum pada Tabel 1.

Zat hasil reaksi ini praktis tidak larut dalam kloroform maupun karbontetraklorida, larut dalam etanol maupun air, dan sedikit larut dalam pelarut campuran (etanol + air). Karakter melalui uji kelarutan ini, mengindikasikan terbentuk 2,3-dinitrobutana, yakni mirip dengan data literatur [2] untuk 2,3-dimetil-2,3-dinitrobutana. Identifikasi secara spektrometri inframerah terhadap nitroetana dan senyawa hasil (diduga 2,3-dinitrobutana) menghasilkan spektrum IR dengan pola yang berbeda. Demikian juga analisis secara spektrofotometri UV juga menghasilkan spektrum dengan pola yang berbeda antara nitroetana dan senyawa hasil sintesis.

Hasil karakterisasi dan identifikasi nitroetana (I) dan hasil (II) menunjukkan bahwa senyawa hasil adalah 2,3-dinitrobutana sebagai hasil reaksi kopling oksidatif dari nitroetana (I).

Tabel 1. Rangkuman Hasil Pengamatan Sintesis 2,3-dinitrobutana

Pereaksi	Perlakuan	Hasil Pengamatan Penelitian
Nitroetana + Na-hidroksida	Suhu 10°C, dengan pengadukan	Larutan tidak berwarna
Penambahan brom	Suhu 0°C, dengan pengadukan	Larutan berwarna putih-keruh
Penambahan etanol	Suhu larutan 70°C, dengan refluks	Larutan kuning-jernih
-	Evaporasi, suhu 70°C	Endapan berwarna kuning



Gambar 2 Mekanisme reaksi kopling oksidatif nitroetana menjadi 2,3-dinitrobutana

Mekanisme reaksi yang terjadi diduga sebagai berikut: (a) *Pertama*, serangan basa OH⁻ pada hidrogen (asam) dari nitroetana membentuk ion karban (⁻CH(CH₃)NO₂), (b) *Kedua*, serangan ion karban terhadap brom menghasilkan bromonitroetana (CH₃CHBrNO₂), dan (c) *Ketiga*, serangan ion karban (⁻CH(CH₃)NO₂) hasil lain langkah (a) terhadap (CH₃CHBrNO₂) menghasilkan (II) seperti diikhtisarkan pada Gambar 2.

Sintesis 1,3-Dihidroksi-2-(4-piridin)-4,5-dimetilimidazolina (DPyDIIm)

Sintesis dan karakterisasi 1,3-dihidroksi-2-(4-piridin)-imidazolina (DPyDIIm) dilakukan dengan dua tahap utama, yakni (1) konversi 2,3-dinitrobutana menjadi 2,3-dihidroksilaminobutana melalui reaksi reduksi dengan seng/amoniumklorida (suasana asam) dan pelarut etanol-air (1+1), (2) reaksi pembentukan cincin imidazolina melalui reaksi 2,3-dihidroksilaminobutana (hasil tahap 1) dengan 4-piridilkarboksaldehida. 2,3-Dihidroksilaminobutana hasil konversi secara reduksi 2,3-dinitrobutana tidak dipisahkan terlebih dahulu dari prosesnya (meta-sintesis), akan tetapi langsung direaksikan dengan 4-piridilkarboksaldehida. Perlakuan percobaan sintesis DPyDIIm tersebut diuraikan sebagai berikut.

Tahap (1): Sintesis 2,3-dihidroksilaminobutana dilakukan dengan mereaksikan 0,125 mol ammonium klorida dengan 0,07 mol 2,3-dinitrobutana dengan katalis 0,125 mol serbuk seng dalam suatu labu leher tiga. Reaksi dilakukan di atas pengaduk magnetik pada suhu di bawah 10 °C. Penambahan seng dilakukan selama 5-6 jam. Setelah seng habis pengadukan dilanjutkan selama satu jam pada suhu kamar. Kemudian campuran yang diperoleh disaring (dengan filter maser no.4). Endapan dicuci dengan etanol 2 × 25 mL. Hasil yang diperoleh berupa filtrat tidak berwarna dan endapan berwarna abu-abu. Filtrat inilah yang digunakan untuk reaksi selanjutnya, yakni sintesis DPyDIIm. *Tahap (2):* Sintesis DPyDIIm dilakukan dengan reaksi kopleng reduktif senyawa hasil reaksi pada tahap (1) yakni 2,3-dihidroksilaminobutana (filtrat tak berwarna) dengan 4-piridilkarboksaldehida. Reaksi tersebut dilakukan dengan melakukan pengadukan pada suhu kamar selama 2 jam. Dari reaksi tersebut diperoleh endapan berwarna kuning-oranye dan filtrat berwarna

kuning jernih. Endapan yang didapat di cuci dengan air lalu dikeringkan dalam desikator. Endapan ini selanjutnya disebut senyawa III.

Pemurnian Senyawa Hasil Sintesis DPyDIIm (III)

Langkah awal yang dilakukan adalah pemilihan pelarut untuk rekristalisasi sebagai metode pemurnian yang dilakukan. Pemilihan pelarut dilakukan dengan cara melarutkan 0,001 g senyawa hasil sintesis dalam 5 mL pelarut metanol, metanol-air (1:1), etanol, etanol-air (1:1), aseton, metil klorida pada keadaan dingin. Dari pelarutan ini senyawa tidak larut pada semua pelarut dalam keadaan dingin. Selanjutnya, melarutkan senyawa tersebut pada keadaan panas dalam penangas air dan mencatat suhu kelarutan senyawa. Senyawa hasil sintesis yang dapat larut dalam pelarut tertentu pada keadaan panas kemudian didinginkan secara perlahan. Pendinginan secara perlahan dilakukan dengan cara memasukkan larutan dalam tabung reaksi dan menutup rapat tabung reaksi serta memberi lubang sebesar ukuran jarum. Pendinginan secara perlahan dilakukan selama ± 3 hari. Dengan pendinginan secara perlahan ternyata, hanya pelarut etanol-air (1:1) yang menghasilkan endapan sehingga dapat disimpulkan bahwa etanol-air (1:1) adalah pelarut yang cocok untuk rekristalisasi (Tabel 2).

Rekristalisasi Senyawa Hasil Sintesis DPyDIIm (III)

Rekristalisasi III dilakukan dengan melarutkan 4 g zat ini dalam etanol-air (1+1) dalam keadaan panas (30-60°C) di atas penangas air sampai semuanya larut. Volume larutan dijaga tetap 100 mL untuk menghindari terjadinya kristalisasi prematur pada saat penyaringan dalam keadaan panas. Senyawa III larut sempurna pada 50°C, selanjutnya larutan disaring dalam keadaan panas. Filtrat ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil dengan memberi satu lubang sebesar ukuran jarum. Kemudian filtrat tersebut dimasukkan dalam termos yang berisi air panas (50°C) ditutup rapat sampai tidak ada uap yang keluar. Pendinginan perlahan dilakukan selama 3 hari. Endapan yang terbentuk pada proses ini disaring. Diperoleh endapan (kuning pucat) sebanyak 0,5 g dan lebih bersih dibandingkan sebelum rekristalisasi. Demikian juga, hasil

Tabel 2 Pemilihan Pelarut untuk Rekrystalisasi

Nama Pelarut	Kelarutan pada Keadaan Dingin	Kelarutan pada Keadaan Panas	Pendinginan Perlahan
Metanol	Tidak larut	Larut	Tidak ada endapan
Metanol-air (1:1)	Tidak larut	Larut	Tidak ada endapan
Etanol	Tidak larut	Larut	Tidak ada endapan
Etanol-air (1:1)	Tidak larut	Larut	Tidak ada endapan
Aseton	Tidak larut	Larut	Ada endapan
Metilklorida	Tidak larut	Larut	Tidak ada endapan

Tabel 3 Kelarutan Senyawa Hasil Sintesis pada berbagai Jenis Pelarut

Nama Pelarut	Kelarutan	Nama Pelarut	Kelarutan
Air	Tidak larut	Etanol-air (1:1)	Larut sebagian
Metanol-air (1:1)	Tidak larut	Etanol-air (2:1)	Larut sebagian
Etanol-air (1:1)	Larut sebagian	Etanol-air (3:1)	Larut
Aseton	Tidak larut	Etanol-air (6:1)	Larut sebagian
Metanol	Tidak larut	Etanol-air (9:1)	Larut sebagian
Etanol	Tidak larut		
Etil asetat	Tidak larut	Air-etanol (2:1)	Tidak larut
		Air-etanol (3:1)	Tidak larut
Dimetilsulfoksida	Larut	Air-etanol (6:1)	Tidak larut
Kloroform	Tidak larut	Air-etanol (9:1)	Tidak larut
Karbontetraklorida	Tidak larut		
n-Heksana	Tidak larut		
Dietyl eter	Tidak larut		

identifikasi dengan spektrofotometri UV menunjukkan hasil yang lebih tajam.

Karakterisasi

Karakterisasi **III** dilakukan berdasarkan kelarutan dan titik lebur. Pelarut yang digunakan untuk uji ini antara lain metanol, etanol, aseton, metanol-air (1:1), etanol-air (1:1), kloroform, n-heksana, karbontetraklorida, etil asetat, etil-eter dan dimetilsulfoksida (masing-masing pelarut yang digunakan untuk uji 5 mL). Kelarutan **III** dalam berbagai jenis pelarut dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan data tersebut, senyawa **III** (1,3-dihidroksil-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina) hanya larut dalam dimetilsulfoksida dan larut sebagian pada pelarut campuran etanol-air (1+1). Etanol-air (1+1) dapat melarutkan senyawa hasil sintesis sebelum dan sesudah rekrystalisasi walaupun kemampuan melarutkannya berkurang setelah pemurnian. Peningkatan kelarutan senyawa hasil sintesis setelah pemurnian dalam (etanol+air) dilakukan dengan meningkatkan atau menurunkan perbandingan jumlah pelarut etanol-air.

Penetapan titik leleh senyawa **III** dilakukan menggunakan alat *melting point Apparatus*

merk SIBATA Mel-270. Hasil penentuan titik leleh senyawa “1,3-dihidroksil-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina”, **III** diperoleh suhu dekomposisi (berubah warna dari kuning-pucat menjadi coklat) pada 210°C dan stabil pada pemanasan lebih lanjut.

Identifikasi Senyawa **III** secara

Spektroskopi

Spektrum UV hasil analisis dengan spektrofotometer UV senyawa **III** “1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina” tampak pada Gambar 3. Pola spektrum UV senyawa ini menunjukkan adanya kombinasi transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ yang khas untuk piridin. Transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ muncul pada λ_{maks} 267,50 nm (puncak 1), sedangkan transisi $n \rightarrow \pi^*$ muncul pada λ_{maks} 229,5 nm (puncak 2). Adanya transisi elektron $n \rightarrow \sigma^*$ pada daerah UV dekat (175-200 nm), yakni pada 195 nm. Serapan ini adalah khas untuk atom yang mempunyai pasangan elektron bebas seperti OH.

Spektrum IR senyawa **III** (“DPyDIIm”) tercantum pada Gambar 4. Dari spektrum IR tersebut menunjukkan adanya serapan pada

daerah gugus fungsi 909-650 cm^{-1} terdapat serapan =C-H keluar bidang yang khas untuk senyawa heteroaromatik. Dua serapan pada 690,58 cm^{-1} dan 775,45 cm^{-1} merupakan serapan khas untuk piridin. Fakta lain yang menunjukkan keberadaan senyawa ini dapat dilihat dari munculnya pasangan serapan pada 1614,56 cm^{-1} dan 1421,67 cm^{-1} yang merupakan uluran C=C aromatik, sedangkan tekuk C=NH aromatik muncul pada 1552,84 cm^{-1} . Muncul pita serapan melebar pada 3383,45 cm^{-1} diduga sebagai pita serapan ulur OH yang khas untuk ikatan hidrogen intermolekuler. Fakta lain yang menunjukkan adanya gugus fungsi ini adalah munculnya pita serapan yang tajam pada 1385,01 cm^{-1} yang merupakan getaran tekuk OH dalam bidang. Munculnya pita serapan kuat dan tajam pada 1552,84 cm^{-1} diduga sebagai ulur tak simetrik N-O. Pita dengan intensitas sedang pada 2922,42 cm^{-1} diduga sebagai pita ulur C-H tak simetrik gugus metil. Keberadaan gugus ini dipastikan dengan munculnya pita serapan tajam pada 1385,01 cm^{-1} yang merupakan pita serapan untuk getaran tekuk C-H gugus metil.

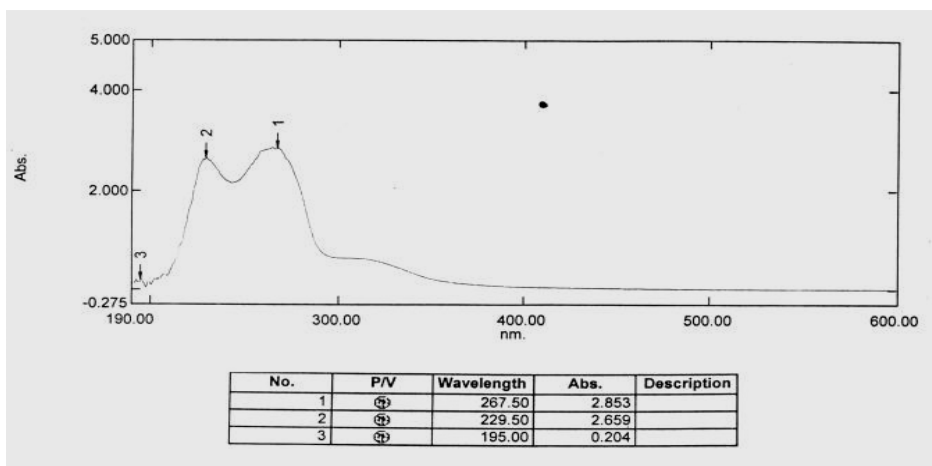
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **III** ("DPyDI_m") hasil sintesis tampak pada Gambar 5. Berdasarkan spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **III** tersebut, muncul 5 puncak pada daerah geseran kimia 0-10 ppm. Munculnya 4 puncak tersebut menunjukkan bahwa terdapat 4 jenis lingkungan proton yang tidak ekuivalen. Geseran kimia δ_{H} muncul pada 8,70 ppm dan 7,78 ppm. Geseran kimia tersebut adalah khas untuk senyawa piridin. Kedua puncak tersebut menggambarkan terdapat dua jenis proton 4-piridil. Selain itu juga terjadi pembelahan puncak singlet menjadi puncak doublet akibat adanya kopling dengan inti tetangga. Tetapan kopling (J_{ab}) dari kedua puncak doublet adalah 0,063 ppm (δ_{H} 8,70 ppm) dan 0,006 ppm (δ_{H} 7,78 ppm). Berdasarkan hasil analisis spektrum $^1\text{H-NMR}$ tersebut menunjukkan bahwa piridin termonosubstitusi sehingga menyebabkan perubahan hubungan geometrik piridin dari kondisi semula.

Selanjutnya apabila dikaji lebih lanjut, geseran kimia C-H pada 8,70 ppm dan 7,78 ppm memberikan luas daerah di bawah puncak sebesar 0,27. Jika luas di bawah puncak ini dibandingkan dengan luas daerah di bawah puncak yang lain maka diperoleh perbandingan 0,27 : 0,99 : 0,19: 0,02 atau 4: 17: 3: 0,3.

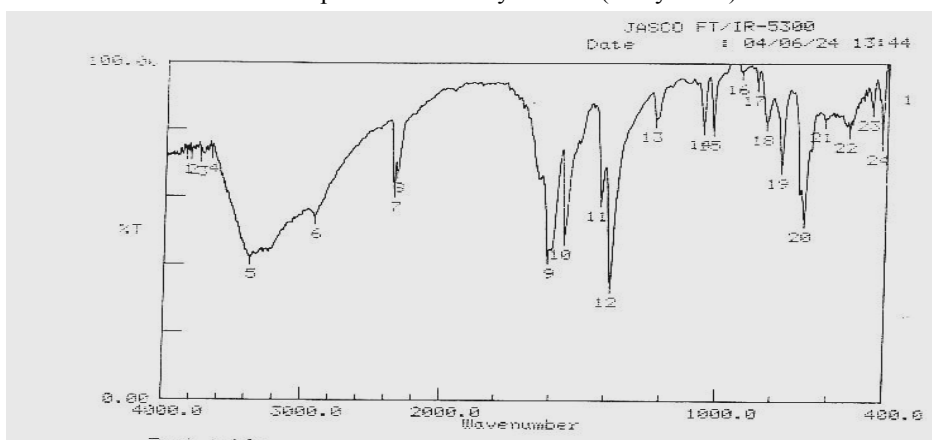
Berdasarkan perbandingan tersebut maka dapat diketahui bahwa luas daerah di bawah kurva pada geseran kimia 8,70 ppm dan 7,78 ppm adalah 4 proton. Jadi terdapat kesesuaian data pada spektrum UV, IR dan $^1\text{H-NMR}$ keberadaan 4-piridil dalam senyawa hasil.

Kerumitan spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa "1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina" hasil sintesis tampak pada daerah geseran kimia 3-4 ppm dimana muncul satu puncak singlet dengan intensitas sangat tinggi. Keberadaan puncak tersebut dimungkinkan adalah keberadaan air dari pelarut DMSO terdeuterisasi (d_6) dan atau dari senyawa hasil sintesis. Keberadaan air dalam pelarut DMSO kerap kali muncul sebagai puncak singlet pada geseran kimia sekitar 3,30 ppm. Luas daerah di bawah puncak menunjukkan nilai sebesar 17 proton. Luas daerah di bawah puncak pada geseran kimia tersebut dimungkinkan adalah hasil akumulasi dari puncak-puncak lain yang ada pada daerah geseran kimia 3-4 ppm. Akumulasi yang paling mungkin terjadi adalah akumulasi proton air dalam pelarut DMSO-terdeuterasi, dan atau dari senyawa itu sendiri serta proton gugus metil. Pelarut DMSO dimungkinkan memberikan sumbangan 6 proton (dua dari gugus metil), 4 proton dari air (yang ada dalam pelarut DMSO), 6 proton dari dua gugus metil dari senyawa dan satu proton dari gugus metin (CH) yang tidak muncul dalam spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil sintesis. Menurut teori proton metil muncul pada geseran kimia 2,50 ppm dalam pelarut DMSO terdeuterasi. Namun demikian keberadaan gugus metil dalam "1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina" hasil sintesis dapat dikuatkan dari spektrum IR senyawa tersebut.

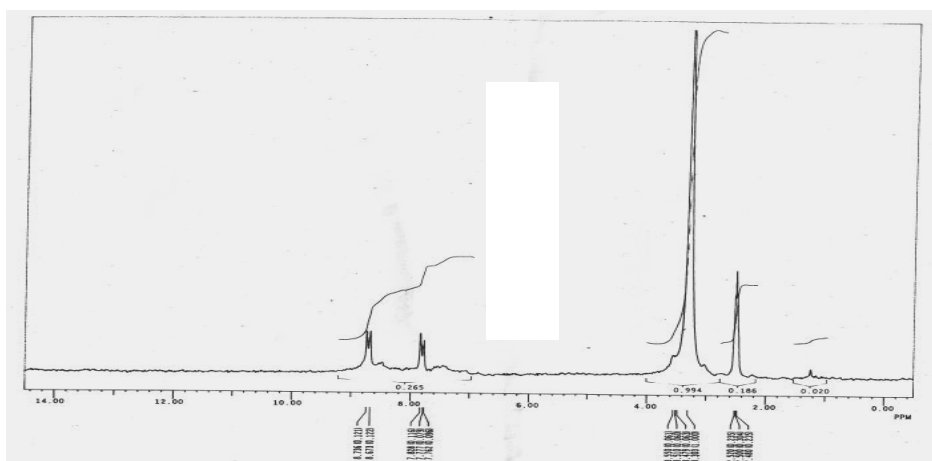
Pada δ_{H} 2,50 ppm muncul puncak mirip singlet yang diduga sebagai puncak dari proton metin (CH). Menurut teori seharusnya proton C-H (metin) muncul pada daerah geseran kimia 2,88 ppm sebagai puncak kuartet. Perbedaan puncak yang muncul dimungkinkan karena kecilnya interaksi (kopel) yang terjadi. Luas daerah di bawah puncak menunjukkan 3 proton (seharusnya menunjukkan 2 proton). Walaupun terdapat perbedaan jenis puncak dan luas daerah integrasi, namun nilai geseran kimia pada daerah tersebut adalah masuk dalam rentang daerah geseran kimia untuk senyawa alifatik tersubstitusi (2-7,5 ppm). Namun



Gambar 3 Spektrum UV senyawa III (“DPyDim”)



Gambar 4 Spektrum IR Senyawa III (“1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina”)

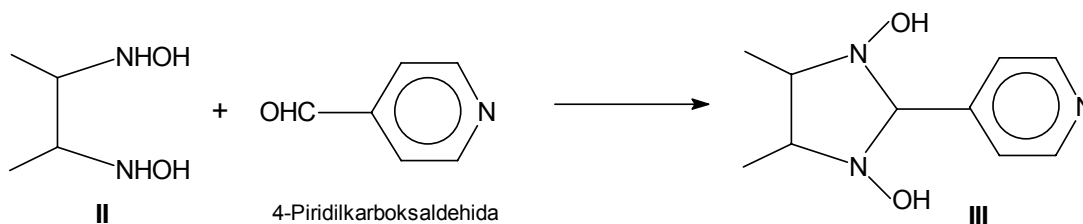


Gambar 5 Spektrum ¹H-NMR “1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina”

spektrum IR nya menunjukkan adanya metin alifatik mengikat metil. Puncak yang sangat lemah muncul pada geseran kimia 1,3 ppm diduga merupakan proton hidroksil. Geseran kimia proton hidroksi tergantung pada pelarut dan konsentrasi. Proton hidroksil akan mengalami perubahan geseran kimia ke arah

medan atas (geseran diamagnetik) dari posisi aslinya jika ada dalam larutan yang sangat encer. Menurut teori geseran kimia proton hidroksil ada pada daerah 0,5-5,5 ppm.

Berdasarkan analisis spektra UV, IR, dan ¹H-NMR maka senyawa **III** hasil sintesis secara bertahap dengan material awalnya nitroetana



Gambar 6 Reaksi pembentukan 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina

tersebut adalah 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina. Reaksi tersebut dapat diikhtisarkan seperti pada Gambar 6.

4. Penutup

Berdasarkan hasil percobaan dan pembahasan pada penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut: (1) Sintesis senyawa 2,3-dinitrobutana telah dapat dilakukan melalui reaksi kopling oksidatif nitroetana dengan pereaksi natrium hidroksida dan brom dalam pelarut etanol-air, (2) Konversi 2,3-dinitrobutana menjadi 2,3-dihidroksilaminobutana dapat berlangsung melalui reaksi reduksi dengan reduktor logam seng di bawah kondisi terdapatnya amonium klorida, dan (3) Senyawa 1,3-dihidroksi-2-(4-piridil)-4,5-dimetilimidazolina (DPyDim) telah berhasil disintesis dari 2,3-dihidroksilaminobutana dengan 4-piridilkarboksaldehida.

5. Daftar Pustaka

- [1]. Tercero, J., Diaz, C., Ribas, J., Maestro, M., Mahta, J and Stoeckli-Evans, H. 2003. Oxamato-Bridge Trinuclear NiCuNi Complexes: A new (NiCuNi)₂ Hexanuclear complex and Supramolecular Structure, Characterization and Magnetic Properties. *Inorg. Chem.* **42**. 3366 – 3373.
- [2]. Dasna, I W., *Complexes Polymerique de Métaux de Transition à Ligands Nitronyl Nitroxide et polycyanure: Synthèse, Structure et Magnétisme*. Thèse, Rennes : Université de Rennes 1, 2001.
- [3]. Dasna, I.W., Golhen, S., Ouahab, L., Pena, O., Daro, N., Sutter, J.-P., “Ferromagnetic interaction in 0D and 2D Mn(II) coordination complexes containing nitronyl nitroxide radicals and

dicyanamide anions: $Mn^{II}(NITpPy)_2[N(CN)_2]_2(H_2O)_2$ and $Mn^{II}(NITpPy)_2[N(CN)_2]_2 \cdot 2CH_3CN$ ”. *C. R. Acad. Sci. Paris, Chimie/Chemistry*, **4**, 125-133, 2001.

[4]. Dasna, I.W., Golhen, S., Ouahab, L., Pena, O., Daro, N., Sutter, J.-P. “Synthesis, X-ray Crystal Structures and Magnetic Properties of $Cu(II)(NITpPy)_2[N(CN)_2]_2 \cdot solv$ (NITpPy = nitronyl nitroxide radical, solv = H₂O or CH₃CN). From Discrete Molecules Solids to 2-D Polymeric Coordination Compounds”. *Inorganic Chimica Acta*, **326**, 37-43, 2001.

[5]. Miller, J. S., “Organometallic- and Organic-based Magnets : New Chemistry and New Materials for the New Millennium.” *Inorg. Chem.* **39**, 4392-4408, 2000.

[6]. Ullman, E.F., L. Call, J.H. Osiecki, (1970) *J. Org. Chem.*, **35**, 3623.

[7]. Ullman, E.F., J.H. Osiecki, D.G.B. Boocock, R. Darcy, (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7049

[8]. Caneschi, A., D. Gatteschi, P. Rey. (1991) The Chemistry and Magnetic Properties of Metal Nitronyl Nitroxide Complexes. *Progress in Inorganic Chemistry*, vol. **331-429**.

[9]. Oshio, H., T. Watanabe, A. Ohto, T. Ito, T. Ikoma, S. Tero-Kubota. (1997) *Inorg. Chem.*, **36**, 3014-3021.

[10]. Dasna, Iwayan, S. Golhen, L. Ouahab, O. Pena, J. Guillvic, M. Fettouhi, (2000) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 129-132.

[11]. Dasna, Iwayan, S. Golhen, L. Ouahab, N. Daro, J.P. (2001) *Polyhedron*, **20**, 137 – 1374

Preparation And Characterisation Of Lanthanum (Iii) Selective Electrode Base 1,10-Diaza-4,7,13,16-Tetraoxacyclo-Octadecane-N,N'-Diacetic Acid As Ionophore

Suyanta ^{a,*}, Susanto Imam Rahayu ^b, Buchari ^c, Indra Noviandri ^d

a, b,c,d) Department of Chemistry, Bandung Institute of Technology, Bandung,
Email : ytakimiauny@yahoo.com.au

Abstract

Lanthanum (III) ion selective electrode base ionophore 1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-N,N'-diaceticacid was researched. Electrode was prepare with inner solution system by the membrane composition contain active ionophore, anionicside KTCPB, plasticizer NPOE and support matrix PVC. A good response (slope 19,93) is produced and electrode can response with detection limit $3,92 \cdot 10^{-6}$ M. The electrode can measure lanthanum ion with a few interfering alkali, earth alkali and transition elements.

Keywords: Lanthanum ion-selective-electrode, PVC membrane, 1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-N,N'-diaceticacid

1. Introduction

Rare earth elements is known as important inorganic compound, because its properties, especially its strong magnetic materials. One of the important element is lanthanum. The available methods for low level determination of rare earth ion in solution includes, ICPMS, ICPAES, X-ray fluorescence spectrometry, etc.¹⁻² These methods are either time consuming, involving multiple sample manipulation and too expensive for most analytical laboratories.

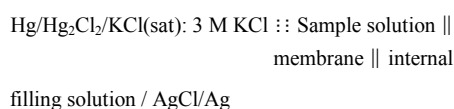
Ion selective electrode (ISE) in potentiometry is one of method analysis that more simple and unexpensive but can used as a good methods. Ion selective electrode with neutral carrier was developed for some element especially for alkali, earth alkali and transition element.³ There are as successful method for analysis. For rare earth element, the system is very little do it some researcher. Only a few report are found in the literature on preparation ore rare earth ion selective electrode.⁴ For the reason, we try to do the ion selective electrode for rare earth element, especially for the lanthanum element.

Macrocycle compound has properties to construct complex compound with some metals. In this case macrocycle function as a ligand.⁵ For example, crown ether with alkali and earth alkali metals ion that very specific complex compound. Macrocycle with N (nitrogen) element usually make complex compound with transition elements. Chang C.A. was synthesis macrocycle compound lariat diaza 18 C 6 (1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-N,N'-diaceticacid and 1,7-Diaza-4,10,13-trioxacyclooctadecane-N,N'-diaceticacid) and study complexation with rare earth element. They conclusion are that compound as selective reagents for lanthanides ion.⁶ For this reason we try to make ion selective electrode for lanthanum element with compound lariat diaza 18 C 6. We vocused with two kind of macrocycle compound that structure can see in the figure 1.⁷

2. Theory

Ion selective electrode membranes are typically investigated under zero current conditions an a galvanic cell. With the outer reference calomel electrode and inner reference Ag/AgCl

electrode, the cell construction is :



The electromotive force (emf) across this cell is the sum of all individual potential contributions. From the example cell, the emf is measured as equation: ⁸

$$E_{\text{mf}} = E_{\text{const}} + E_j + E_m \quad 1$$

Where E_m is the membrane potential and E_j is the liquid junction potential at the sample / bridge electrolyte interface, which can either be kept reasonably small and constant under well defined condition or be estimated according to the Henderson formalism.⁹ So value emf only estimated with membrane potential.

Membrane is usually interposed between the sample and an inner reference electrolyte. It is common to divide the membrane potential (E_m) into three separate potential contributions, namely the phase boundary potential (E_{PB}) at both interfaces and the diffusion potential (E_{Diff}) within the ion selective membrane.

$$E_m = E_{\text{Diff}} + 2 E_{\text{PB}} \quad 2$$

For ion selective electrode, the membrane internal diffusion potential is zero if no ion concentration gradients occur. The concentration ion in the inner solution are constant, so potential boundary in inner interface is constant. From the assumption value E_m is:

$$E_m = E_{\text{Const}} + E_{\text{PB}} \quad 3$$

Where E_{PB} is the phase boundary potential at the membrane sample interface.

Value of boundary potential can be derived from basic thermodynamic consideration. First, the electrochemical potential, (μ_e), is formulated for the aqueous phase.⁸⁻¹¹ From the membrane system we can separate two kind phase. There are water phase and organic phase. If the electrochemical potential in the water phase as:

$$\begin{aligned} \mu_e(\text{aq}) &= \mu(\text{aq}) + zF\phi(\text{aq}) \\ &= \mu^0(\text{aq}) + RT \ln a_i(\text{aq}) + zF\phi(\text{aq}) \end{aligned} \quad 4$$

So at the same condition, electrochemical potential at the organic phase is:

$$\begin{aligned} \mu_e(\text{o}) &= \mu(\text{o}) + zF\phi(\text{o}) \\ &= \mu^0(\text{o}) + RT \ln a_i(\text{o}) + zF\phi(\text{o}) \end{aligned} \quad 5$$

Where μ is chemical potential (μ^0 = standard chemical potential), z , ion valence ; a_i activity of free ion i ; ϕ , electric potential, and R , T , F are general gas constant, absolute temperature and Faraday constant.

If it was assumed that ion transfer and complexes reaction at interphase very fast and happened equilibrium equation, so the chemical potential at two phase will be equal. We can construct boundary phase potential as dispute of electrical potential at two phase.

$$E_{\text{PB}} = \Delta\phi = -\frac{\mu^0(\text{o}) - \mu^0(\text{aq})}{zF} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(\text{aq})}{a_i(\text{o})} \quad 6$$

From the equation 3 and 6, we can formulate the membrane potential as follow:

$$E_m = E_{\text{constan}} - \frac{\mu^0(\text{o}) - \mu^0(\text{aq})}{zF} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(\text{aq})}{a_i(\text{o})} + \frac{RT}{zF} \ln a_i(\text{aq}) \quad 7$$

If the value of ion activity in organic phase $a_i(\text{org})$ is constant and other variable is constant, so equation will be follow:

$$E_m = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_i(\text{aq}) \quad 8$$

This equation is call as Nernst equation. From the equation we can look that membrane potential only identical with a number analyt ion activity.

2. Experimental Reagent

Stock solutions (10^{-1} M) of lanthanum (III) were prepared by dissolving $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99,9 % purity, Merck, Germany) in distilled water. Ionophore 1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane- N,N' -diacetic acid was purchased from ACROS ORGANIC, New Jersey, USA. The plasticizer *o*-nitro phenyl octyl ether (NPOE) and anionicside potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate (KTCBP) were purchased from Fluka Chemie AG, Switzerland. Tetrahydrofuran (THF) used dissolving the membrane components was purchased from Merck. All other chemicals used in analytical determinations were guaranteed reagent grade purity.

Membrane and Electrode Preparation

The membranes solution was prepared by dissolving 10.0 mg 1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-N,N'-diacetic acid, 45 mg PVC, 90 mg NPOE and 5 mg KTCPB in 3 mL of THF. The solution was evaporated on the glass with square 1,5 x 4 cm². Electrode was prepared by glued tube electrode to the membrane. Inner electrode reference Ag/AgCl and inner solution (mixture KCl 10⁻³ M and La³⁺ 10⁻³ M) is set in the tube and connected to cable. The electrode was conditioned before potentiometry measurement by immersing it in 10⁻³ M LaCl₃ solution for 24 hour.

Electrode System and EMF Measurement

Cell configuration used for potentiometry measurement were of the type:

Hg/Hg₂Cl₂/KCl(sat): 3 M KCl :: Sample solution || membrane || internal filling solution / AgCl/Ag

EMF measurement were carried out with calomel electrode (ORION) coupled with ORION pH/Ion-meter 420A. The concentration of lanthanum (III) ion in the sample solution was varied from 10⁻¹ to 10⁻⁸ M in stirred solution. The EMF value were recorded when the reading ion-meter became stable. The pH value of the sample solution were adjusted with NaOH and HCl/HNO₃ and measured with pH-meter. The activity of metals ion were based on their activity coefficient, γ , as calculated from the modified Debye Huckel equation:

$$\text{Log } \gamma = -0,511 Z^2 \left[\frac{\sqrt{\mu}}{1+1,5 \sqrt{\mu}} \right] - 0,2 \mu$$

Where μ is ionic strength and Z is valence of the concerned ion. All the EMF measurement we performed at 25 ± 3 °C.

4. Results And Discussions

Response characteristic of La(III)-selective electrode

The potential response electrode was affected by composition of membrane electrode. For the reason we varied the composition of membrane to result a good potential response. The variation of membrane electrode can see in table 1.

Effect pH to the potential response

We make the series of solution of La³⁺ with the pH from 1 to 10, by added HCl and NaOH

solution. Potential solution is measured by the cell system and the result can see in the figure 2.

From the figure that pH relatively constant at pH 3 to 7. The pH dropped at 8 to 10, this is because the lanthanum ion was precipitated to form hydroxide metal. So, we will work at pH 4.5.

Effect of macrocycle lariat compound

To look effect the macrocycle compound we compare two kind macrocycle lariat compound. There are (1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-N,N'-diacetic acid (ionophore 1) and N,N'-bis-methoxy methyl-1,10-Diaza 18 crown 6 (ionophore 2). The capability of the electrode can see with response potential in figure 3.

From the figure we can see that electrode with ionophore 1 has a good response than electrode with ionophore 2. Detection limit electrode with ionophore 1 is better than ionophore 2. Range measurement electrode 1 is more widely than electrode 2 (electrode 1: 10⁻⁵ – 10⁻¹ and electrode 2: 10⁻⁵ – 10⁻² M). The electrode can response analogue about 30 second and has life time about 2 month.

Selectivity of electrode

The potentiometric selectivity coefficient which reflected the relative response of the membrane sensor for the primary ion over other ion present in solution were investigated by the match potential method (MPM)¹³⁻¹⁴. The result of comparison potential response primary ion and interfering ion can see in figure 4.

From the data in figure 4, the value $K_{A,B}^{Pot}$ is calculated with MPM system. The result for all ion interference can see in table 2.

As seen, for ions alkali, earth alkali and some transition ions have selectivity coefficient value in the order 10⁻³ – 10⁻². These is indicating that they do not disturb the function of La-ISE. But for the rare earth ion, they are relatively disturb for measurement of ion La³⁺. Otherwise this electrode can measure total rare earth ion in the sample.

Application

The electrode was used to measure number of lanthanum ion in waste water sample from Bandung Institute of Technology laboratory. The result can see in table 2 that two method

are produce the same result. Application in potentiometry titration with ESI-La as working electrode is do it. The result of titration can see in figure 5.

5. Conclusion

This work describe the study of potentiometry ion La-ISE with ionophore lariat diaza 18 crown 6 in membrane electrode. This ISE is useful for measurement lanthanum ion with e few interfering alkali, earth alkali and transition element.

6. References

1. Houk, R.S., Fassel, F.A., Flesch, G.D., Svec H.J., (1980), Inductively coupled argon plasma as an ion source for mas spectrometric determination of trace element, *Analytical Chemistry*, 52, 2283-2289.
2. Anonim, (1988), *Analytical methode for Atomic Absorption Spectrophotometer, AA100*, New York: Perkin Elmer.
3. Masuda A., Nomura N., Tanaka T., (1973), *Geochim Cosmochim Acta*, 37, 239-245.
4. Morf WE., Simon W., (1978), *Ion Selective Electrode in Analytical Chemistry*, Freiser H Ed, Plenum, New York.
5. Choudhury DA., Obata T. and Kamato S., (1996) Samarium (III) selective electrodes using neutral bis (thiaalkylxanthato)alkanes, *Anal Chem*, 68, 366-378.
6. Zolotov Xu A., (1997), *Macrocyclic Compound an Analytical Chemistry*, John Willey and Sons Inc, New York.
7. Chang CA., Ochaya Ven O., (1986), *Inorg Chem*, 25, 355-358.
8. Fabre B., Simonet J: *Coordination Chemistry Reviews*, 1998, 178-180, 1211-1250.
9. Bakker E., Bullhman P., Pretch E., (1997), Carrier based ion selective electrodes and bulk optodes, ionophores for potentiometric and optical sensors, *Chem Rev*, 3083-3132.
10. Gadzeppo VP., Christian GD., (1984), Determination of selectivity coefficients of ion selective electrodes by a matched-potential-method, *Anal Chim Acta*, 64, 279.
11. Umezawa Y., Umezawa K., Sato H., (1995), Selectivity coefficients for ion selective electrode: recommended methods for reporting K_{AB} value, *Pure Appl Chem*, 67, 507.
12. Shamsipur M., Yousefi M., Ganzali M.R., (2000)., PVC Based 1,3,5-trithiane sensor for cerium (III) Ions, *Anal Chem* , 72, 2391-1394.

Lampiran

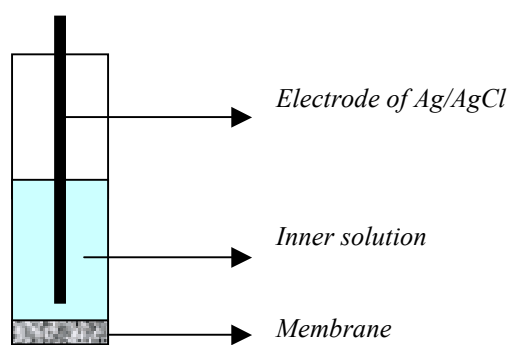


Figure 2. Shape of membrane electrode

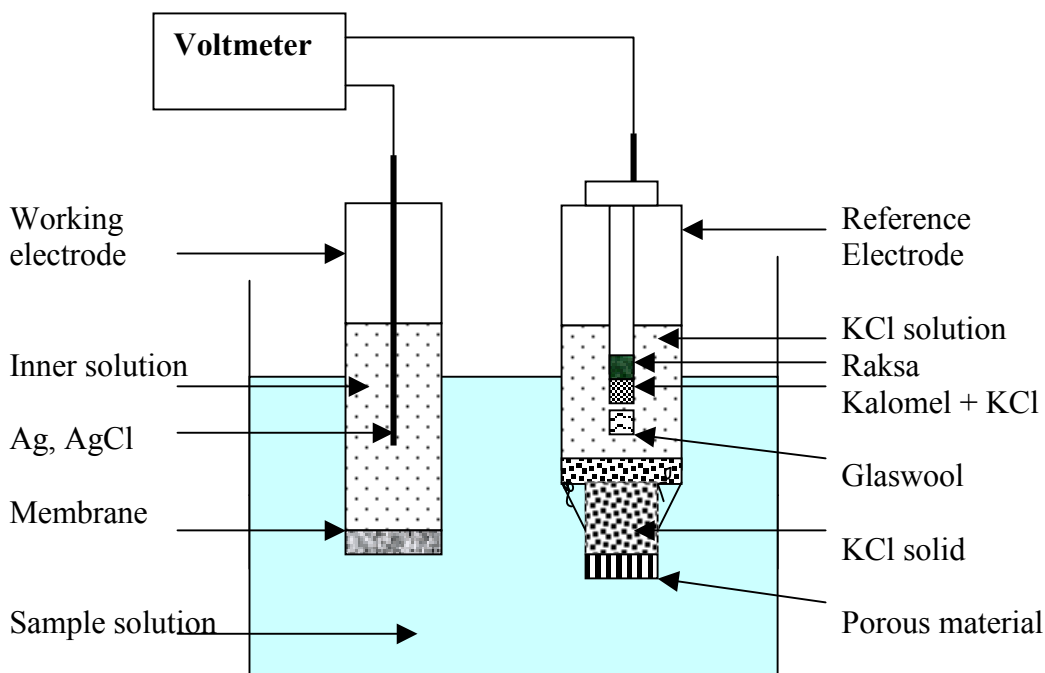


Figure 3. Potential measurement with potentiometry system

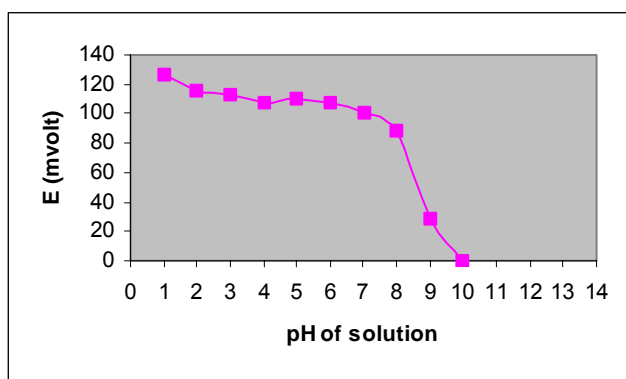


Figure 4: Effect pH to the potential response

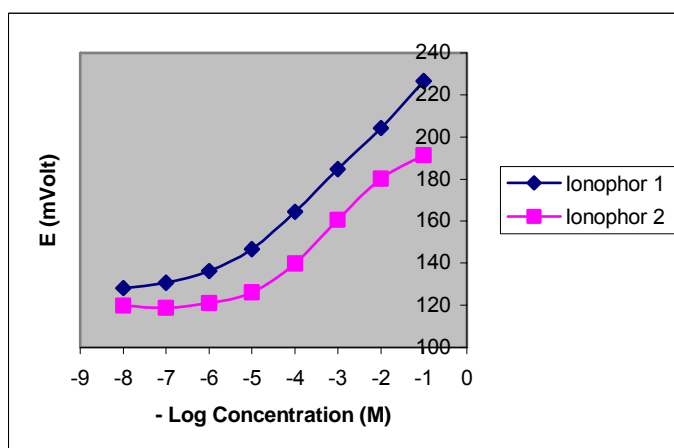


Figure 5: Characteristic response potential electrode of two kind compound ionophore

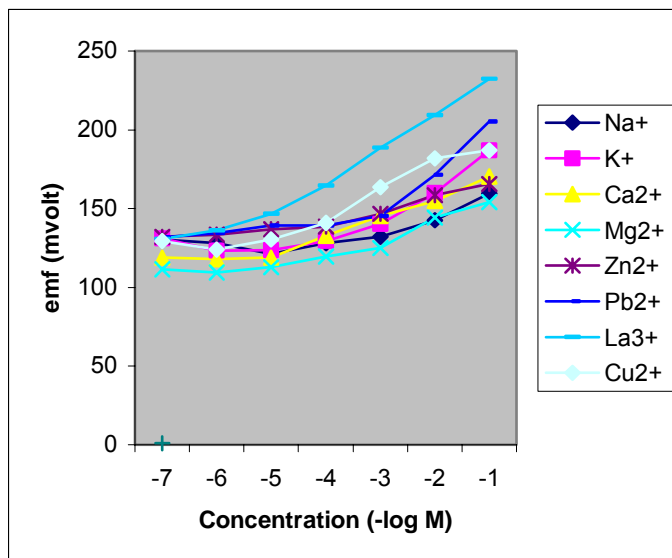


Figure 4: Potential response of La-ISE to ion La³⁺ and others

Table 1. Composition of membrane electrode and Nernstian response

No	PVC (mg)	NPOE (mg)	DACDA (mg)	KTCPB (mg)	Slope
1	44,6 (32,32%)	83,0 (56,42%)	14,4 (9,79%)	5,1 (3,47%)	12,27±1,51
2	45,3 (30,54%)	82,5 (55,63%)	10,2 (6,87%)	10,3 (6,95%)	18,51±1,11
3	45,5 (30,11%)	90,2 (59,69%)	10,0 (6,62%)	5,4 (3,57%)	19,93±1,62
4	49,4 (32,93%)	90,1 (60,06%)	5,2 (3,47%)	5,3 (3,53%)	21,50±1,72
5	50,0 (33,67%)	90,2 (60,74%)	5,1 (3,43%)	3,2 (2,15%)	34,19±3,06
6	50,2 (34,15%)	90,2 (61,36%)	5,0 (3,40%)	1,6 (1,09%)	33,03±0,76

Tale 2: Selectivity coefficient of various interfering ion*

M ⁿ⁺	$K_{A,B}^{Pot}$
Na ⁺	$7,10 \cdot 10^{-4}$
K ⁺	$5,36 \cdot 10^{-3}$
Ca ²⁺	$2,94 \cdot 10^{-4}$
Mg ²⁺	$8,85 \cdot 10^{-4}$
Zn ²⁺	$3,24 \cdot 10^{-4}$
Pb ²⁺	$4,46 \cdot 10^{-3}$
Cu ²⁺	$1,99 \cdot 10^{-2}$

*) Condition reference solution $1 \cdot 10^{-7}$ M LaCl₃, primary ion (A) $10^{-6} - 10^{-1}$ M La³⁺ and interfering ion (B) 10^{-2} M Mⁿ⁺

Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa dari Fraksi Aseton Talus Lichen *Ramalina Javanica* Nyl

Suyanto¹⁾, Suwarso, W.P.²⁾, Kosela, S.²⁾, Suwito, H.¹⁾, Winiati, S.³⁾, Dai⁴⁾, Krohn, K.⁴⁾

1) Universitas Airlangga, Surabaya

2) Universitas Indonesia, Jakarta

3) Universitas Negeri Jakarta

4) Institute of Organic Chemistry, University of Paderborn, Germany

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur beberapa senyawa pada ekstrak aseton talus lichen *Ramalina Javanica* Nyl. Isolasi dilakukan dengan kromatografi kolom secara gradien pelarut *n*-heksana-EtOAc, kemudian diikuti dengan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif secara berulang dengan eluen yang sama (17:1), sehingga diperoleh senyawa murni. Struktur ditentukan secara spektroskopi UV, IR dan NMR dan diperoleh senyawa derivat gliserol (1) dan derivat glikol (2).

Kata kunci: lichen, *Ramalina Javanica* Nyl, derivat gliserol, derivat glikol

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya tumbuhan yang berkhasiat obat yang dapat digunakan sebagai bahan baku jamu, obat maupun industri kimia (Matsyeh, 1999). Salah satu tumbuhan yang berkhasiat obat adalah lichen. Di Indonesia lichen *Usnea dasyypoga* Rohl digunakan sebagai obat tradisional untuk penyakit tuberkulosis, disentri dan diuretika (Suwarso, 1999). Sejumlah senyawa yang terdapat pada lichen menunjukkan aktivitas antibiotika. Antibiotika dari lichen lebih efektif dari pinisilin (Alvin, 1963). Lichen *Ramalina Javanica* Nyl termasuk tumbuhan suku rendah yang hidup pada ketinggian 1400 m di atas permukaan air laut, mempunyai talus berbentuk benang berwarna hijau kekuningan, pangkal berwarna hijau dan ujungnya berwarna kuning. Apotesia jarang berbentuk bulat datar berwarna merah bata dan tumbuh pada ranting pohon cemara (Winiati, 1999). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur senyawa pada fraksi aseton.

2. Percobaan

Lichen *Ramalina Javanica* Nyl diperoleh dari Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat pada tahun 2001. Sebanyak 2 kg serbuk lichen *Ramalina Javanica* Nyl direndam dalam *n*-heksana

selama 2 minggu. Filtrat dipekatkan dengan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak heksana. Ampas direndam dalam aseton selama 2 minggu, kemudian filtratnya dipekatkan dengan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak aseton sebanyak 40 g. Sebanyak 30 g ekstrak aseton dilakukan kromatografi kolom secara gradien pelarut dengan eluen *n*-heksana-EtOAc, fraksi dengan R_f yang sama dikumpulkan. Dari fraksi kuning-hijau sebanyak 3 g dilakukan kromatografi kolom secara gradien pelarut kemudian diikuti dengan KLT preparatif. Kromatografi kolom dan KLT preparatif dilakukan secara berulang sehingga diperoleh senyawa murni (1) dan (2). Struktur molekul senyawa murni ditentukan secara spektroskopi.

Alat yang digunakan adalah Melting Point Apparatus Fisher Johns, UV Shimadzu Pharmaspec 1700, FTIR Jasco-5300, FTNMR Bruker 500 MHz.

Kromatografi kolom menggunakan Silika gel Merck 60 untuk KLT preparatif menggunakan aluminium plate Merck 0.2 mm.

3. Hasil dan Pembahasan

Dari penelitian diperoleh hasil sebagai berikut:

Senyawa (1) kristal kuning pucat, titik leleh 175-177°C. Spektrum UV(λ_{maks} , nm, EtOAc):

255, 268. IR (KBr, ν cm^{-1}): 2922, 1736, 1647, 1151, 1087.

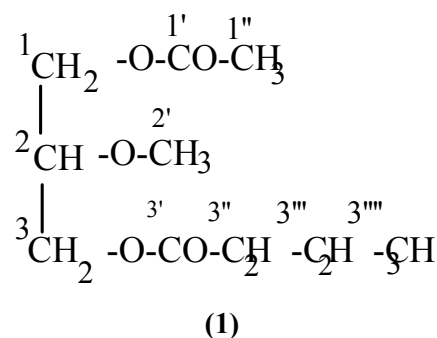
$^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ tertera pada Tabel 1.

Senyawa (2) kristal merah muda titik leleh 128-130°C. Spektrum UV(λ_{maks} nm, EtOAc): 262, 269. IR (KBr, ν cm^{-1}): 2918, 2851, 2361, 1734, 1647, 1464, 1072. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ tertera pada Tabel 2.

Pembahasan

Senyawa (1): Puncak pada δ 4.15 (q, 2H) menunjukkan adanya gugus metilen yang terikat pada atom karbon dan atom oksigen dari gugus fungsi ester. Adanya gugus metilen ini diperkuat oleh adanya puncak pada δ 53.38 ppm, sedangkan gugus fungsi ester ditunjukkan oleh pita pada spectrum IR 1736 dan 1647 cm^{-1} . Adanya gugus ester didukung oleh data dari $^{13}\text{C-NMR}$ pada δ 171.10 ppm yaitu atom karbon kuarternar. Puncak pada δ 2.06 ppm (s, 3H) adalah proton dari gugus metil yang mengikat karbonil (C=O). Hal ini diperkuat oleh pita serapan IR pada 2922 dan 1151 cm^{-1} serta puncak pada δ 30.9 ppm. Gugus metin yang mengikat atom oksigesn muncul pada δ 3.69 dan 76.7 ppm. Hal ini juga diperkuat oleh

adanya pita stretching C-O-C pada 1087 cm^{-1} . Adapun puncak pada δ 3.52 dan 50.87 ppm menunjukkan adanya gugus metoksi (-OMe). Puncak pada δ 31.57 dan 4.15 ppm menunjukkan gugus metilen yang terikat pada atom oksigen dari gugus fungsi ester. Sedangkan puncak pada δ 2.19 dan 60.36 ppm menunjukkan adanya gugus metilen yang terikat karbonil (C=O), demikian juga δ 1.59 dan 22.63 ppm adalah gugus metilen alkana. Puncak pada 0.90 dan 21.00 ppm adalah gugus metil alkana. Dari pembahasan tersebut dapat diduga bahwa senyawa (1) mempunyai struktur:



Senyawa (2):
Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ tertera pada

Tabel 1. Pergeseran kimia proton dan karbon senyawa (1)

No at C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Jumlah proton
1	53.38	4.15	2H
1'	171.10	-	-
1''	30.90	2.06	3H
2	76.70	3.69	1H
2'	50.87	3.52	3H
3	31.57	4.15	2H
3'	171.10	-	-
3''	60.36	2.19	2H
3'''	22.63	1.59	2H
3''''	18.40	0.90	3H

Tabel 2. Pergeseran kimia proton dan karbon senyawa (2)

No. atom C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	Jumlah proton
1	29.69	4.15	2H
1'	50.87	3.51	3H
2	60.37	4.15	2H
2'	171.10	-	-
2''	31.92	2.19	2H
2'''	29.65	2.06	2H
2''''	29.35	1.64	2H
2'''''	22.68	1.31	2H
2''''''	21.02	0.91	3H



Proceeding of The 6th ITB Joint Seminar on Chemistry



Materials Science Using Neutron Powder Diffraction

Takashi Kamiyama

Neutron Science Laboratory (KENS)
Institute of Materials Structure Science
High Energy Accelerator Research Organization (KEK)
1-1, Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801 JAPAN

Abstract

The neutron powder diffraction is recognized as a powerful technique to clarify the relationship between the crystal structures and the properties of functional materials. Its application fields has been expanding in materials science. In the field, not only the limited epoch-making experiments, but also a large number of ordinary experiments with diversity and interdisciplinary approach would result in prominent scientific results. Brand-new powder diffractometers (NPD's), which appear or will soon appear in Europe, Australia, US and Asian facilities, will be expected to exceed the present limit of application, and stimulate the existing 60 NPD's in the world. I will talk about the present materials science using neutron powder diffraction. I will also talk about new Japanese NPD's project, and then the prospect of NPD's impact.

Paper is not available

Triterpenoid pentasiklik yang berkeaktifan antimalaria dari daun *Erythrina variegata* (Leguminosae)

Tati Herlina^{1*}, Agustono¹, Abdul Muis¹, Unang Supratman¹, Anas Subarnas², Supriyatna Sutardjo², Syafruddin³, dan Hideo Hayashi⁴

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jatinangor 45643, Sumedang, Indonesia

²Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jatinangor 45643, Sumedang, Indonesia
Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta

³Laboratory of Natural Products Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Science, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan
Email : tatat_04her@yahoo.com

Abstrak

Dalam penelitian berkelanjutan kami dalam pencarian senyawa antimalaria baru dari tumbuhan Indonesia diperoleh hasil bahwa ekstrak metanol daun *Erythrina variegata* menunjukkan aktivitas antimalaria yang signifikan terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara in vitro. Ekstrak metanol dipisahkan komponen-komponennya dengan kombinasi kolom kromatografi pada silika gel diperoleh suatu senyawa antimalaria. Struktur kimia senyawa aktif ditetapkan berdasarkan data-data spektroskopi dan perbandingan data dari senyawa yang berhubungan dari penelitian sebelumnya, dan diidentifikasi sebagai turunan triterpenoid pentasiklik, 3β -11 α -28-trihidroksi-olean-12-en. Aktivitas antimalaria senyawa 3β -11 α -28-trihidroksi-olean-12-en memperlihatkan nilai IC_{50} 0,243 μ g/mL terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara in vitro.

Kata kunci : Antimalaria, *Erythrina variegata*, Leguminosae, triterpenoid pentasiklik

1. Pendahuluan

Malaria merupakan suatu penyakit infeksi yang sampai kini masih menjadi masalah kesehatan yang serius dan kompleks yang dihadapi umat manusia pada abad ini. Penyakit ini terutama disebabkan oleh empat spesies parasit protozoa dari jenis *Plasmodium*. Setiap tahunnya lebih dari satu juta sampai sekitar 300-500 juta manusia di dunia meninggal akibat terinfeksi malaria (Trigg, 1998). Hal ini diperkirakan hampir setengah dari populasi dunia beresiko terinfeksi malaria, dimana laju kematian tertinggi antara lain terjadi pada anak-anak di bawah umur lima tahun (Saxena, *et al.*, 2003). Di Sahara bagian Afrika saja, setengah juta anak-anak di bawah umur lima tahun

meninggal setiap tahunnya (Snow, *et al.*, 2004). Penyakit malaria paling sering terjadi di daerah tropis, daerah beriklim panas dan basah. Daerah ini meliputi daerah bagian Mexico, Haiti, Amerika Tengah, Amerika Selatan, Afrika, Timur Tengah dan Sub-Benua India, Asia Tenggara, Korea, Indonesia dan Oseania (Shulman, *et al.*, 1992).

P. Falciparum merupakan organisme yang menyebabkan malaria tropika memperlihatkan adanya daya tahan terhadap kloroquin dan beberapa obat antimalaria sintetik lainnya di Asia Tenggara. Resistensi terhadap mefloquin dan halofoin menyebabkan berkembangnya multiresisten terhadap obat antimalaria di

Afrika (Wernsdorfer, 1994). Saat ini analog artemisin telah diperkenalkan dan menunjukkan aktivitas yang sangat efektif terutama pada *P. falciparum* yang resisten terhadap obat antimalaria. Akan tetapi, hasil pengamatan terhadap induksi obat dan hubungan antara dosis dengan neurotoksisitas dalam hewan, telah dikuatirkan tentang keamanan yang ditimbulkan oleh senyawa ini pada manusia (Bhattacharjee and Karle, 1999). Oleh karena itu dibutuhkan usaha yang serius untuk mencari obat antimalaria baru dan relatif tidak toksik terhadap manusia.

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar di dunia dengan lebih dari 30 ribu spesies tanaman berkhasiat mengobati melalui penelitian ilmiah. Hanya sekitar 180 spesies tersebut telah dimanfaatkan dalam tanaman obat tradisional oleh industri obat tradisional Indonesia (DepKes, 2000). Hal ini disebabkan pemanfaatan tumbuhan obat Indonesia untuk mengobati suatu penyakit biasanya hanya berdasarkan pengalaman empiris yang diwariskan secara turun temurun tanpa disertai data penunjang yang memenuhi persyaratan. Untuk dapat diterima dalam pengobatan modern, beberapa persyaratan yang harus dipenuhi terutama adalah kandungan zat aktifnya, sehingga selain khasiat, tingkat keamanannya dapat diprediksi dengan mudah (Atamini, 2001).

Tumbuhan obat Indonesia yang telah banyak digunakan oleh masyarakat dalam pengobatan malaria secara tradisional adalah *E. variegata* (Mursito, 2002). *E. variegata* di Indonesia dikenal dengan sebutan dadap ayam (Heyne, 1987). Bagian tumbuhan *E. variegata* yang digunakan dalam pengobatan tradisional adalah kulit batang, daun, akar dan biji yang dilaporkan mengandung senyawa-senyawa alkaloid (Chawla, *et al.*, 1988), serta beberapa senyawa golongan flavonoid dan isoflavonoid (Tanaka, *et al.*, 2000; dan Sato, *et al.*, 2000).

Dalam penelitian berkelanjutan guna untuk pencarian obat antimalaria baru yang berasal dari tumbuhan obat Indonesia, kami telah mengisolasi senyawa antimalaria dari daun *E. variegata*. Pada makalah ini kami akan memaparkan isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas senyawa antimalaria dari daun *E. variegata*.

2. Percobaan

Umum. Penentuan titik leleh dilakukan pada alat Fischer-John Melting point apparatus. Spektrum IR diukur dengan FTIR-Shimadzu series 8400. Spektrum ^1H dan ^{13}C -NMR diukur menggunakan spectra JEOL JNM A-400, yang bekerja pada 400 MHz (^1H -NMR) dan 125 MHz (^{13}C -NMR) dengan TMS sebagai standar internal. Kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan Si gel Merck 60 GF₂₅₄. Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada plat berlapis Si gel Merck 60 GF₂₅₄.

Pengumpulan Bahan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dadap ayam (*E. variegata*) yang diperoleh dari hutan lindung di daerah Ciater Kabupaten Subang. Bahan ini dideterminasi di laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Teknologi Bandung. Parasit *P. falciparum* galur FCR-3/A2 resisten kloroquin diperoleh dari Lembaga Eijkman, Jakarta.

Ekstraksi dan isolasi. Serbuk daun *E. variegata* (2 Kg) diekstraksi dengan metanol dengan teknik maserasi tiga kali berturut-turut masing-masing 24 jam menghasilkan ekstrak metanol (150 g). Selanjutnya ekstrak metanol dipartisi dengan diklorometana-air (3:1) menghasilkan fraksi diklorometana (50 g). Fraksi diklorometana ini dilarutkan ke dalam metanol 20% air yang selanjutnya dipartisi berturut-turut ke dalam *n*-heksan, etilasetat, dan *n*-butanol, diperoleh fraksi *n*-heksan (22 g), fraksi etilasetat (10 g), fraksi butanol (3 g), dan fraksi metanol 20% air sisa (15 g). Fraksi etilasetat menunjukkan aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum*. Fraksi etilasetat (8 g) difraksionasi dengan cara kromatografi vakum cair (KVC) dengan eluen campuran *n*-heksan-etilasetat secara bergradien, menghasilkan sepuluh fraksi utama. Fraksi utama ke empat ($E_4 = 286$ mg) difraksionasi lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi kolom tekan (KKT) eluen (*n*-heksan-kloroform-metanol=0,5:9:0,5) diperoleh enam fraksi gabungan. Fraksi ke enam ($E_{46} = 141,8$ mg) difraksionasi lebih lanjut dengan KKT menggunakan silika gel G 60 (*n*-heksan-kloroform-etilasetat = 6:1:3), menghasilkan empat fraksi gabungan. Fraksi gabungan ke tiga ($E_{463} = 5,8$ mg) dimurnikan dengan KKT menggunakan silika gel GF₂₅₄ (*n*-heksan-

kloform-aseton = 1,5:6:2,5) menghasilkan senyawa (5,5 mg).

Data Hasil Percobaan. Senyawa aktif diperoleh sebagai kristal jarum tak berwarna, t.l. 255-257 °C, Spektrum FT-IR (pellet KBr) ν_{maks} : 3393, 2946, 1660, 1463, 1385, 1338, 1082, 1040, dan 757 cm^{-1} . Spektrum ^1H NMR (400 MHz, piridin- d_5), δ_{H} ppm : 1,92 (*td*; $J = 13,6$; 4,3 Hz; 1H-1); 1,16 (*dd*; $J = 13,6$; 4,3 Hz; 1H-1); 1,76 (*dd*; $J = 13,6$; 6,8 Hz; 1H-2); 2,40 (*m*; 1H-2); 3,63 (1H-3); 1,04 (*m*; 1H-5); 1,45 (*td*; $J = 12,8$; 3,3 Hz; 1H-6); 1,36 (*m*; 1H-6); 1,73 (*d*; $J = 11,6$ Hz; 1H-7); 1,48 (*dd*; $J = 8,4$; 3,3 Hz; 1H-7); 1,63 (*d*; $J = 10,8$ Hz; 1H-9); 4,52 (*d*; $J = 10,8$ Hz; 1H-11); 5,34 (*s*; 1H-12); 1,82 (*d*; $J = 4,0$ Hz; H-15); 2,24 (*m*; 1H-15); 2,20 (*d*; $J = 10,0$ Hz; 1H-16); 1,66 (*d*; $J = 10,0$ Hz; 1H-16); 1,94 (*m*; 1H-18); 1,86 (*br s*; 1H-19); 1,33 (*m*; 1H-19); 1,60 (*m*; 1H-21); 1,54 (*m*; 1H-21); 1,86 (*m*; 1H-22); 2,06 (*m*; 1H-22); 3H-23); 1,10 (*s*; 3H-24); 1,23 (*s*; 3H-25); 1,29 (*s*; 3H-26); 1,56 (*s*; 3H-27); 3,64 (*d*; 11,0 Hz; 1H-28); 3,72 (*d*; 11,0 Hz; 1H-28); 0,95 (*s*; 3H-29); dan 0,98 (*s*; 3H-30) Spektrum ^{13}C NMR (100 MHz, piridin- d_5) 40,06 (CH₂-1); 28,67 (CH₂-2); 80,13 (CH-3); 43,22 (C-4); 56,37 (CH-5); 19,14 (CH₂-6); 33,54 (CH₂-7); 42,38 (C-8); 48,15 (CH-9); 33,54 (C-10); 75,56 (CH-11); 122,44 (CH-12); 144,85 (C-13); 42,22 (C-14); 25,74 (CH₂-15); 28,46 (CH₂-16); 33,35 (C-17); 46,83 (CH-18); 45,35 (CH-19); 28,46 (C-20); 37,04 (CH₂-21); 38,04 (CH₂-22); 37,04 (CH₃-23); 16,28 (CH₃-24); 21,21 (CH₃-25); 17,09; (CH₃-26); 26,09 (CH₃-27); 64,61 (CH₂-28); 30,91 (CH₃-29); dan 23,60 (CH₃-30).

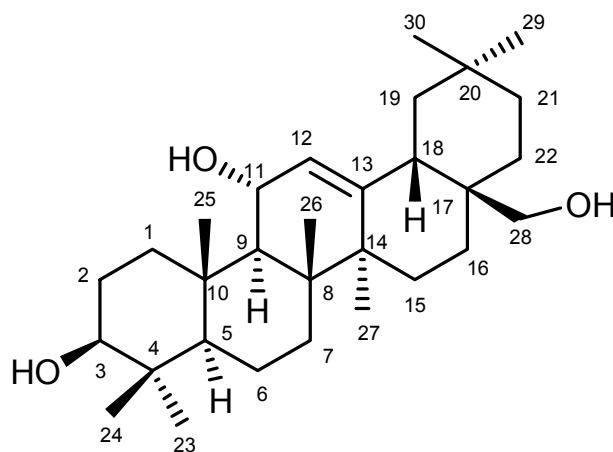
Evaluasi Biologi. Isolat beku *P. falciparum* galur FCR-3/A2 dibiakan pada medium RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) yang diperkaya dengan larutan dapar HEPES; pH 7,4 dan 10% serum darah manusia. Pemiakan dilakukan pada cawan petri 24 sumur dan disimpan di dalam *candle jar* pada inkubator yang bersuhu 37°C. Kemampuan menghambat pertumbuhan parasit diamati dan dihitung dibawah mikroskop. Selanjutnya dianalisis statistik untuk memperoleh aktivitas penghambatan (IC₅₀) komponen antimalaria.

3. Hasil Dan Pembahasan

Ekstrak metanol pekat daun *E. variegata* dipartisi antara diklorometana dan air. Ekstrak diklorometana dipartisi lebih lanjut dengan *n*-heksan, etilasetat, dan *n*-butanol. Fraksi

etilasetat kemudian dipisahkan melalui kombinasi kromatografi kolom menggunakan silika gel G 60 dan TLC preparatif silika gel GF₂₅₄ menghasilkan senyawa aktif.

Senyawa aktif menunjukkan rumus molekul C₃₀H₅₀O₃ berdasarkan data ^1H -dan ^{13}C -NMR, menunjukkan bahwa senyawa aktif mempunyai enam ekivalensi ikatan rangkap. Spektrum inframerah menunjukkan adanya serapan yang kuat pada bilangan gelombang ν_{maks} 3393 cm^{-1} dari regangan ulur gugus O-H, diikuti dengan serapan pada bilangan gelombang ν_{maks} 1092 dan 1040 cm^{-1} berturut-turut yang merupakan regangan ulur dari gugus C-O alkohol sekunder dan alkohol primer. Pada bilangan gelombang ν_{maks} 2946 cm^{-1} terdapat serapan yang sangat kuat dari regangan ulur gugus C-H alifatik dari CH₂ diikuti dengan serapan pada ν_{maks} 1463 cm^{-1} yang merupakan tekukan C-H alifatik dari CH₂ dan 1385 cm^{-1} tekukan C-H alifatik dari CH₃ yang khas untuk golongan triterpenoid (Mathias, *et al.*, 2000). Pada bilangan gelombang ν_{maks} 1660 cm^{-1} terdapat regangan ulur C=C alifatik dengan intensitas lemah diikuti serapan pada bilangan gelombang pada ν_{maks} 757 cm^{-1} dengan intensitas kuat dan tajam yang merupakan karakteristik dari tekukan ke dalam bidang gugus C-H rangkap dua (=C-H) siklik. Data-data spektrum pada bilangan gelombang ν_{maks} 1660 dan 758 cm^{-1} tersebut mengindikasikan suatu senyawa dari golongan triterpenoid yang mengandung sebuah ikatan rangkap dua pada posisi 12 (13) dalam kerangka senyawa triterpen pentasiklik 12-en (Cole and Thornton, 1957). Spektrum ^1H -NMR menunjukkan adanya 7 signal singlet dari gugus metilen (CH₃) tersier pada geseran kimia δ_{H} 1,24 (3H-23); 1,10 (3H-24); 1,23 (3H-25); 1,29 (3H-26); 1,56 (3H-27); 0,95 (3H-29); dan 0,98 (3H-30). Hasil perhitungan tetapan penjodohan proton-proton diketahui bahwa nilai tetapan penjodohan antara proton C-11 (H-11) pada geseran kimia δ_{H} 4,52 (*d*; $J = 10,8$ Hz; 1H) yang teroksigenasi dan proton C-9 (H-9) pada geseran kimia δ_{H} 1,63 (*d*; $J = 10,8$ Hz; 1H); diduga terjadinya penjodohan aksial, sehingga dapat dinyatakan bahwa posisi proton pada C-11 adalah aksial (H-11 β) dan posisi gugus hidroksil pada C-11 adalah ekuatorial (11 α -OH). Posisi ekuatorial gugus hidroksi pada C-3 (H-3 aksial) telah dibuktikan dengan membandingkan geseran kimia gugus C-1 (δ_{C}



Gambar. Struktur 3 β ,11 α , 28-trihidroksiolean-12-en

40,06; 2H), C-2 (δ_C 28,67; 2H), C-3 (δ_C 80,13; H), C-4 (δ_C 43,22), C-5 (δ_C 56,37; H), dan C-24 (δ_C 16,28; 3H). Spektrum ^1H NMR juga memperlihatkan adanya penjodohan geminal pada geseran kimia kimia δ_H 1,92 triplet doublet ($J = 13,6; 4,3; 1\text{H}-1$) dengan proton pada δ_H 1,16 doublet doublet ($J = 13,6; 4,3; 1\text{H}-1$) yang mengalami penjodohan visinal dengan proton pada geseran kimia δ_H 1,76 doublet doublet ($J = 13,6; 6,8 \text{ Hz}; 1\text{H}-2$) dan proton pada geseran kimia δ_H 1,45 triplet doublet ($J = 12,8; 3,3 \text{ Hz}; 1\text{H}-6$) yang mengalami penjodohan visinal dengan proton pada geseran kimia δ_H 1,48 doublet doublet ($J = 8,4; 3,3 \text{ Hz}; 1\text{H}-7$), yang merupakan karakteristik dari proton yang berada pada cincin A dan B senyawa triterpenoid. Spektrum ^{13}C -NMR memperlihatkan adanya 30 signal yang terdiri dari 28 atom karbon sp^3 dan 2 atom karbon sp^2 . Dari ke-30 signal tersebut, terdapat 7 atom karbon metilen, 10 atom karbon etilen, 6 atom karbon metin dan 7 atom karbon kuartener. Tujuh atom karbon kuartener pada senyawa merupakan karakteristik untuk kelompok senyawa triterpenoid dengan kerangka struktur pentasiklik (Nakanisi, *et al.*, 1974). Diantara ke-30 signal tersebut terdapat tiga atom karbon teroksigenasi pada geseran kimia δ_C 80,13 (C-3), 75,56 (C-11) dan 64,61 (C-28) dan satu pasang atom karbon rangkap dua pada geseran kimia δ_C 122,44 (C-12) dan 144,85 (C-13) yang khas untuk atom karbon-12 (13) senyawa triterpen pentasiklik golongan olean. Berdasarkan data-data spektra di atas dan data-data yang telah diperoleh pada penelitian

sebelumnya (Mathias, *et al.*, 2000; Debella, *et al.*, 2000; Barreiros, *et al.*, 2002; Okada, *et al.*, 2003; dan Tanaka, *et al.*, 2003) struktur planar dari senyawa aktif ditetapkan sebagai triterpen pentasiklik 3 β ,11 α , 28-trihidroksiolean-12-en. Aktivitas biologis senyawa 3 β -11 α -28-trihidroksi-olean-12-en memperlihatkan nilai IC_{50} 0,243 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terhadap pertumbuhan *P. falciparum* secara *in vitro*.

5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas dana yang diberikan melalui Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (Hibah Pasca) Tahun Anggaran 2004.
2. Dr. Tomoyuki Fujita dan Dr. Kohki Akiyama pada Laboratory of Natural Products Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan atas pengukuran spektra NMR.
3. PT. Biofarma (Persero) Bandung, dan Lembaga Eijkman, Jakarta atas pengujian aktivitas biologis.

6. Daftar Pustaka

- Atamini, F. Tiga senyawa baru cassanefurano diterpen hasil isolasi dari daging biji Bogore (*Caesalpinia erista* L.), asal Sulawesi Selatan sebagai bahan dasar obat antimalaria, *Sci. & Tech.* 2001, 2, 1, 12-24.
- Barreiros, M.L.; David, J.M.; Pereira, P.A.; Maria L.S. and David J.P. Fatty acid esters of

Tati Herlina, Agustono, Abdul Muis, Unang Supratman, Anas Subarnas, Supriyatna Sutardjo, Syafruddin, dan Hideo Hayashi

- triterpenes from *Erythroxylum passerium*, *J. Braz. Chem. Soc.* 2002, 13, 5, 387-399.
- Bhattacharjyer, A.K.; Karle, J.M. *Chem. Res. Toxicol.* 1999, 12, 422-428.
- Cole, A.R.H. and Thornton, D.W. Infrared spectra of natural products, Part III: the identification and location of ethylenic double bonds in pentacyclic triterpenoids, *J. Chem. Soc.* 1957, 57, 1, 1332-1338.
- Chawla, A.S.; Krishnan, T.R.; Jackson, A.H.; Scalabrin, D.A. and Stuttgart, W.G. Alkaloidal constituents of *Erythrina variegata* bark, *Planta medica*, 1988, 54, 6, 526-528.
- Debella, A.; Haslinger, E.; Martin, G.S.; Bucar, F., Abebe, D. And Kunert, O. Triterpenoid saponins and sapogenin lactones from *Albizia gummifera*, *Phytochemistry*, 2000, 53, 885-892.
- DepKes, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Jakarta, 2000, 10-11.
- Heyne, K. Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid II, 1987, Balai Kehutanan Indonesia.
- Kitagawa, I.; Mahmud, T.; Simanjuntak, P.; Hori, K.; Uji, T. and Shibuya, H. Dehatrine, an antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloid from the the Indonesian medicinal plant *Belischiamedia madang*, isolated as a mixture of two rotational isomers. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41, 997-999.
- Mathias, L.; Ivo, J.C.; Vieira, R.B. and Edson, R.F. A New pentacyclic triterpene isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Myroxylon peruiferum*), *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 2, 195-198.
- Mursito, B. Ramuan Tradisional untuk Penyakit Malaria, Cetakan Pertama, Penebar Swadaya, Jakarta, 2002.
- Nakanisi, K.; Toshiro, G.; Ito, S.; Natori, S. and Shigeo, N. *Natural Product Chemistry*, 1974, 1.
- Okada, Y.; Ayako, M. and Toru, O. A new triterpenoid isolated from *Lagerstronemia speciosa* (L.) Pers. *Chem. Pharm. Bull.* 2003, 51, 4, 452-454.
- Sato, M.; Tanaka, H.; Fujiwara, S.; Hirata, M.; Yamaguchi, R.; Etoh, H.; Tokuda, C. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral Bacteria, *Phytomedicine*, 2003, 10, 5, 427-433.
- Saxena, S.; Neerja, P.D.C. and Bhakuni, R.S. Antimalarial Agents from Natural Sources, *Current Science*, 2003, 85, 9, 1314-1329.
- Shulman, S.T.; John, P.D. and Herbert, M.S. Dasar Biologi dan Klinis Penyakit Infeksi, 1992, Penterjemah, Soeprapto S.; Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, Indonesia.
- Snow, R.W.; Craig, M.H.; Dechman, U. and Lesueur, D. *Parasitol. Today*, 1999, 15, 99,.
- Tanaka, H.; Etoh, H.; Shimizu, H.; Makita, T. and Tateishi Y. Two new isoflavonoids from *Erythrina variegata*, *Planta Med.*; 2000, 66, 6, 578-579.
- Tanaka, H.; Hirata, M.; Etoh, H.; Shimizu, H.; Sako, M.; Murata, J.; Murata, H.; Darnaedi, D. and Fukai, T. Eryvarins F and G, two 3-phenoxychromones from the roots of *Erythrina variegata*, *Phytochemistry*, 2003, 62, 8, 1243-1246.
- Trigg, P.I. and Kondrachine A.V. The Current Global Malaria Situation, In Irwin W. Sherman, Malaria Parasite Biologi, Patogenesis and Protection, ASM Press, Washington, DC, 1998, 11-22.
- Wernsdorfer, W.H. Epidemiology of drug resistance in malaria, *Acta. Trop.*; 1994, 56, 143-156.

Isolasi Dan Identifikasi Suatu Limonoid Aphanamixin Dari Ekstrak *n*-Heksana Kulit Batang Tumbuhan *Aphanamixis polystachya* (WALL) R. N. Parker (MELIACEAE)

Tiaras Sinambela¹⁾, Tukiran^{1)*}, Umi Syafa'ah¹⁾, dan Kuniyoshi Shimizu²⁾

¹Jurusan KIMIA, FMIPA, UNESA, Jalan Kampus Ketintang, Surabaya, 60231, Indonesia
*e-mail : btukiran@yahoo.com

²Laboratory of Wood Sciences, Department of Forest and Forest Product Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan
e-mail : shimizu@agr.kyushu-u.ac.jp

Abstrak

Telah dilakukan isolasi suatu senyawa limonoid, aphanamixin dari ekstrak *n*-heksana kulit batang tumbuhan *Aphanamixis polystachya* (WALL) R. N. Parker (MELIACEAE). Identifikasi struktur dilakukan berdasarkan data spektroskopi (UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR) serta membandingkannya dengan data literatur untuk senyawa yang bersangkutan.

Kata kunci : *Aphanamixis polystachya*, Limonoid, Meliaceae

1. Pendahuluan

Aphanamixis polystachya adalah tumbuhan yang termasuk famili Meliaceae. Meliaceae merupakan famili tumbuhan yang cukup besar, terdiri dari 50 genus dan sekitar 1400 spesies. Di Indonesia terdapat sekitar 33 genus dan 405 spesies, tumbuh dalam bentuk pepohonan atau tanaman berkayu. Tumbuhan ini selain mempunyai nilai unggul karena kayunya yang berkualitas tinggi dan tahan terhadap serangan beberapa jenis hama serangga (*insect repellants* dan insektisidal), juga memperlihatkan bioaktivitas yang menarik, seperti antibakteri, antimalaria, antijamur, dan antitumor (Barneji *et al.*, 1984, Castellanos *et al.*, 2002, Biswas *et al.*, 2002). Oleh karena itu, diyakini bahwa tumbuhan *A. polystachya* juga mengandung berbagai senyawa yang potensial sebagai bioinsektisida.

Berdasarkan penelusuran literatur mengenai fitokimia tumbuhan Meliaceae yang telah dilaporkan, untuk studi fitokimia tumbuhan *A. polystachya* ini belum banyak dilakukan oleh peneliti lain di dunia, kecuali suatu alkaloid

utama rohitudin (Connolly *et al.*, 1976), beberapa senyawa triterpen seperti aphanamin, aphanamixin, aphanamol I dan II, dan suatu seskuiterpen daucan (Chatterjee *et al.*, 1970), serta suatu limonoid amoorastatin (Mulholland *et al.*, 1999). Sebagai komparasi, salah satu spesies Meliaceae yang lain, yaitu tumbuhan nimba (*Azadirachta indica*) telah berhasil diisolasi sekitar 135 senyawa. Dengan demikian memberi peluang untuk melakukan suatu penelitian yang intensif dan berkesinambungan terhadap fitokimia spesies tersebut. Kini, kami juga sedang melakukan penelitian yang dimaksud terhadap spesies-spesies lain dari tumbuhan Meliaceae, seperti *Khaya senegalensis*, *Aglaiia odorata*, dan *Sandoricum ketjapi*. Suatu penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi suatu senyawa dari ekstrak *n*-heksana kulit batang tumbuhan *A. polystachya* telah dilakukan dan ditemukan suatu limonoid yang dikenal sebagai aphanamixin.

2. Percobaan

Bahan.

Tumbuhan *A. polystachya* diperoleh dari Kebun Percobaan Carita Banten, Jawa Barat dan identifikasi spesimen tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriensis, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI, Bogor. Bahan tumbuhan yang digunakan ialah kulit batang tumbuhan tersebut, dan setelah dibersihkan dari kotoran/debu yang melekat, kemudian dikeringkan di udara terbuka dan digiling hingga menjadi serbuk halus. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain *n*-heksana, kloroform, etil asetat, aseton, metanol baik yang teknis maupun pro analitik (p.a), pereaksi Liebermann-Burchard, plat kromatografi lapis tipis (KLT), silika gel Merck 60 GF₂₅₄, silika gel Merck 60 (70-230 mesh), silika gel Merck 60 (230-400 mesh), silika gel Merck Kiesegel 60 GF₂₅₄ 0,25 mm.

Alat

Peralatan yang dipergunakan antara lain peralatan gelas, timbangan, *rotary vacuum evaporator*, mantel pemanas, alat ukur titik leleh Fisher Johns, alat ukur putaran optik polarimeter Perkin-Elmer 341, kolom kromatografi, bejana kromatografi, spektrometer UV Pharmaspec UV-1700 UV-Vis spectrophotometer Shimadzu, spektrometer IR model 500 spectrophotometer Buck Scientific Inc, dan spektrometer JEOL JNM-AL 300/AL 400 FT-NMR yang beroperasi pada 399,65 MHz untuk ¹H-NMR dan 100,4 MHz untuk ¹³C-NMR, dengan menggunakan larutan standar internal.

Ekstraksi

Serbuk halus kulit batang *A. polystachya* sebanyak 2,5 kg dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana (3 x 5 L) pada suhu kamar selama 24 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan penyaring Buchner dan filtrat yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan diperoleh ekstrak *n*-heksana.

Isolasi

Ekstrak *n*-heksana (25,3 g) yang diperoleh dipisahkan komponen kimianya secara kromatografi cair vakum menggunakan silika gel Merck 60 GF₂₅₄ sebagai fasa diam dengan eluen berturut-turut *n*-heksana, *n*-heksana-etil asetat, dan methanol secara berulang-ulang sebanyak 4 kali. Hasil pemisahan dimonitor dengan KLT yang dielusi menggunakan eluen campuran *n*-heksana-etil asetat.

Fraksi-fraksi yang bersesuaian nilai R_f-nya digabung selanjutnya dipisahkan secara berulang kali melalui kromatografi kolom gravitasi menggunakan silika gel 60 (70-230 mesh) dengan sistem eluen *n*-heksana-kloroform-etil asetat.

Pemisahan juga dilakukan secara berulang kali melalui kromatografi kolom tekan menggunakan silika gel 60 (230-400 mesh) sebagai fasa diam dengan eluen *n*-heksana-kloroform-metanol sehingga didapatkan fraksi yang menunjukkan satu noda/spot suatu senyawa.

Pemurnian

Fraksi tersebut kemudian direkristalisasi dengan pelarut campuran *n*-heksana-etil asetat. Selanjutnya, diuji dengan pereaksi Liebermann-Buchard, maka warna jingga atau ungu yang terbentuk menandakan adanya senyawa terpenoid (limonoid).

Identifikasi

Spektroskopi ultraviolet (UV)

Isolat sebanyak 1 mg dilarutkan dalam metanol sampai volumenya 10 mL kemudian diukur panjang gelombang maksimumnya. Efek batokromik diamati dengan penambahan pereaksi geser yaitu NaOH.

Spektroskopi inframerah (IR)

Kristal sebanyak 1 % digerus dengan 99 % KBr bebas air dalam mortal sampai homogen. Kemudian ditekan dengan alat hidrolik khusus, dan diukur vibrasinya pada daerah bilangan gelombang 4000-650 cm⁻¹.

Spektroskopi resonansi magnetic inti proton (¹H-NMR)

Kristal sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 1 mL CDCl₃, dan spektrum dibuat pada pergeseran kimia, δ_H 0 – 12 ppm.

Spektroskopi resonansi magnetic inti karbon (¹³C-NMR)

Kristal sebanyak 20 mg juga dilarutkan dalam 1 mL CDCl₃, dan spektrum dibuat pada pergeseran kimia, δ_C 0 – 200 ppm.

3. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi terhadap kulit batang *A. polystachya* dihasilkan ekstrak *n*-heksana berupa minyak kental kuning kecoklatan sebanyak 25,3 g. Pemisahan dilakukan terhadap ekstrak tersebut melalui kromatografi vakum cair sebanyak empat kali menghasilkan sejumlah fraksi. Terhadap fraksi-fraksi yang bersesuaian nilai

Rf-nya digabung dan selanjutnya dipisahkan melalui kromatografi kolom gravitasi dan tekan secara berulang kali hingga menghasilkan suatu fraksi yang menunjukkan satu spot. Terhadap fraksi ini, setelah diuapkan selanjutnya direkristalisasi dan diperoleh suatu kristal putih sebanyak 76 mg. Terjadinya perubahan warna jingga dengan penambahan pereaksi Liebermann-Buchard terhadap sedikit kristal ini, menunjukkan adanya suatu senyawa terpenoid (limonoid).

Data spektrum UV senyawa isolat dengan pelarut *n*-heksana menunjukkan adanya serapan pada daerah 290 nm. Daerah serapan demikian menunjukkan adanya kromofor ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa isolat tersebut, yaitu unit struktur dari furano. Penambahan pereaksi NaOH tidak mengalami pergeseran yang signifikan berarti tidak ada kromofor -OH fenolik yang bersifat asam.

Data spektrum IR senyawa ini menunjukkan adanya gugus karbonil lakton (COO⁻) di daerah 1704,4 dan 1736,2 cm⁻¹, gugus -OH pada daerah 3435 cm⁻¹, vibrasi ulur -CH di daerah 2950,4 dan 2878,4 cm⁻¹ [dapat sebagai gugus metil (CH₃), metilen (-CH₂-), ataupun metin (-CH-)], ikatan rangkap karbon-karbon (-C=C-) pada daerah 1653,1 – 1460,6 cm⁻¹, dan adanya

gugus alkohol alifatik (-C-OH) pada daerah 1248,2 cm⁻¹.

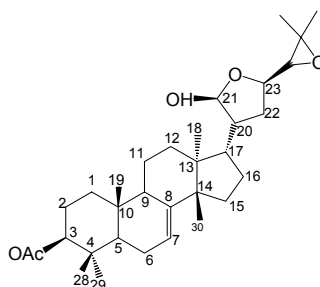
Berdasarkan data literatur spektrum ¹³C-NMR untuk sejumlah senyawa limonoid yang telah berhasil diisolasi dari sejumlah tumbuhan Meliaceae, sebagaimana yang telah dilaporkan (Mulholland *et al.*, 1999) dan dengan tetap mempertimbangkan pengetahuan kemotaksonomi dari tumbuhan tersebut, maka dapat diketahui bahwa spektrum ¹³C-NMR senyawa isolat banyak memperlihatkan sejumlah sinyal yang tidak berbeda jauh (mendekati) dengan kerangka dasar suatu limonoid, **aphanamixin** yang diisolasi dari tumbuhan yang sama.

Kemiripan data ¹³C-NMR senyawa isolat ini juga didukung dengan pemunculan sejumlah sinyal pada spektrum ¹H-NMR yang juga dimiliki pada spektrum ¹H-NMR dari aphanamixin (Chatterjee *et al.*, 1970). Selain itu sinyal dari spektrum ¹H-NMR senyawa isolat juga memberikan 1 gugus AcO- singlet pada δ 2,70 (3H) dan gugus -OH singlet pada δ 3,18 (1H). Sayangnya, data spektrum lengkap ¹H- dan ¹³C-NMR dari aphanamixin tidak dilaporkan.

Berikut adalah data spektrum ¹H- dan ¹³C-

Tabel : Data Spektrum ¹H- dan ¹³C-NMR (δ ppm, CDCl₃) Senyawa Isolat

No. C	¹ H-NMR senyawa isolat	¹³ C-NMR senyawa isolat	No. C	¹ H-NMR senyawa isolat	¹³ C-NMR senyawa isolat
1	0,84	12,8	10	-	38,5
2	0,97	12,9	11	-	40,5
3	1,01	18,9	12	-	45,4
4	1,27	23,3	13	-	46,6
5	1,30	23,8	14	-	53,8
6	1,31	26,2	15	-	78,4
7	1,32	27,4	16	-	118,1
8	2,07	28,5	17	-	145,8
9	3,18	36,6			



Aphanamixin

NMR senyawa isolat, sebagaimana dapat dilihat pada tabel 1.

Dari spektrum pada sejumlah data tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah aphanamixin, yang struktur lengkapnya dapat disajikan berikut.

4. Kesimpulan

Studi fitokimia terhadap tumbuhan *A. polystachya* telah dilakukan dan dari penelitian ini telah berhasil ditemukan suatu senyawa limonoid, aphanamixin. Jenis senyawa limonoid ini merupakan komponen utama yang terdapat di hampir kebanyakan tumbuhan Meliaceae dan implikasinya akan banyak ditemukan senyawa jenis limonoid lainnya dari spesies tersebut serta dua spesies Meliaceae berikutnya, seperti *Khaya senegalensis*, *Aglaia odorata*, dan *Sandoricum ketjapi*, yang kini sedang dalam proses penelitian kelompok kami.

5. Ucapan terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada staf Kebun Percobaan Carita Banten, Jawa Barat yang telah menyediakan bahan tumbuhan yang dibutuhkan. Terima kasih disampaikan pula

kepada staf Herbarium Bogoriense, LIPI, Bogor, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan tersebut.

6. Daftar Pustaka

- Barneji B., Nigam S.K., (1984). Wood Constituent of Meliaceae : a review. *Fitoterapia*. LV. 3-36.
- Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K., Bandyopadhyay U., (2002). Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*. 82 (11). 1336-1345.
- Castellanos L., Correa R.S.D., Martinez E., Calderon J.S., (2002). Oleanane Triterpenoids from *Cedrela montana* (Meliaceae). *Z. Naturforsch.* 57c. 575-578.
- Chatterjee A., Kundu A.B., Chakraborty T., Chandrasekharan S., (1970). The Structure and Stereochemistry of Aphanamixin and Aphanamixinin. *Tetrahedron* Vol. 26, pp. 1859-1867.
- Connolly J.D., Okorie D.A., de Wit, D.L., Taylor, D.A.H., (1976). Struktur of Dregeanin and Rohitukin. *Chem.Comm.*, 909.
- Mulholland D.A. dan Naidoo N., (1999). Limonoids from Aphanamixis polystachya. *Phytochemistry*. 51. 927 – 930.

Kopolimerisasi Cangkok Asam Akrilat Pada Serat Rayon Dengan Teknik Pra-irradiasi Peroksida

Tita Puspitasari¹⁾, Yanti Sabarinah Soebianto¹⁾ dan Endang Asijati Ichsan²⁾

1) Puslitbang Isotop dan Radiasi, BATAN, Jalan Cinere Pasar Jum'at, Jakarta Selatan 12070, Indonesia
e-mail: titapus2000@yahoo.com

2) Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

Abstrak

Kopolimerisasi cangkok atau grafting adalah suatu metoda yang banyak dilakukan untuk memodifikasi suatu polimer sehingga memiliki sifat baru yang berbeda dari polimer asalnya. Teknik grafting yang diinduksi oleh radiasi ada dua macam yaitu simultan (polimer dan monomer diiradiasi secara bersamaan dalam keadaan vakum) dan pra-irradiasi (polimer diiradiasi terlebih dahulu dalam keadaan vakum atau dalam media udara, kemudian direaksikan dengan monomer dalam keadaan vakum atau dalam atmosfer nitrogen). Pada penelitian ini digunakan teknik pra-irradiasi peroksida (polimer diiradiasi dalam media udara) karena prosesnya sederhana. Serat rayon digrafting dengan menggunakan monomer asam akrilat yang telah dilarutkan dalam H₂O : methanol (90:10) dengan berbagai konsentrasi. Irradiasi dilakukan dengan menggunakan irradiator sinar gamma (Co-60) dalam media udara dengan variasi total dosis dan laju dosis. Grafting dilakukan dalam atmosfer N₂. Deaerasi awal terhadap pelarut air dapat menurunkan kadar oksigen terlarut sampai dengan 27% dan menaikkan persentase grafting sebanyak 24% – 68%, serta meningkatkan kebolehdadian grafting yang dihasilkan. Persentase grafting meningkat dengan meningkatnya laju dosis serta meningkatnya total dosis sampai batas tertentu. Penambahan volume atau peningkatan rasio monomer AAc terhadap rayon tidak menyebabkan proses berjalan lebih efisien walaupun persentase grafting meningkat. Temperatur dan waktu optimal proses grafting adalah 45°C dan 45 menit.

Kata kunci: Asam akrilat; Kopolimerisasi cangkok; Pra-Irradiasi peroksida; Rayon

1. Pendahuluan

Kopolimerisasi tempel (grafting) adalah suatu metoda yang banyak dilakukan untuk memodifikasi suatu bahan polimer sehingga memiliki sifat baru yang berbeda dari polimer asalnya. Polimer yang telah dimodifikasi tersebut banyak digunakan sebagai penukar ion, super absorbent, *drug release*, lensa kontak dan lain-lain. Teknik kopolimerisasi tempel yang diinduksi dengan radiasi ada dua macam yaitu cara simultan dan pra-irradiasi baik dalam vakum maupun dalam media udara. Sistem pra-irradiasi dalam media udara atau inisiasi peroksida lebih mudah dilakukan karena sampel diiradiasi tanpa melalui proses pemakuman, selanjutnya proses

grafting bisa dilakukan dalam keadaan vakum atau dalam atmosfer nitrogen.

Keberhasilan terjadinya proses grafting dengan inisiasi peroksida terjadi pada saat pemanasan, dimana terjadi dekomposisi peroksida yang dilanjutkan dengan terjadinya reaksi antara radikal peroksida yang terbentuk dengan monomer yang ditambahkan. Pada keadaan vakum, reaksi grafting lebih mudah terjadi dibandingkan dalam atmosfer nitrogen. Pada proses grafting dalam atmosfer nitrogen, deaerasi dengan mengalirkan gas N₂ saja terhadap larutan monomer selama proses grafting ternyata tidak cukup menghilangkan oksigen terlarut yang merupakan inhibitor

terjadinya reaksi grafting.

Untuk meningkatkan kebolehdajian grafting asam akrilat (AAc) pada serat rayon dalam atmosfer nitrogen, dalam penelitian ini dilakukan terlebih dahulu deaerasi awal terhadap pelarut H₂O sebelum dicampur dengan methanol dengan perbandingan (90:10), campuran keduanya kemudian digunakan untuk melarutkan AAc.

2. Percobaan

Bahan Serat rayon (viscose rayon staple fibre) produksi PT. Indo-Bharat Rayon, dibersihkan dengan pelarut n-heksan teknis menggunakan pengeksrak soklet selama kurang lebih 3 jam dan selanjutnya dikeringkan dalam oven. Larutan AAc dengan konsentrasi tertentu dibuat dengan cara melarutkan AAc pekat produksi Merck ke dalam pelarut H₂O:Methanol(90:10), dengan terlebih dahulu melakukan deaerasi terhadap H₂O-nya.

Prosedur Grafting. Sejumlah serat rayon yang bersih dan kering diiradiasi dengan menggunakan iradiator sinar gamma dari sumber Co-60 (IRPASENA dan IRKA) dalam media udara dengan dosis dan laju dosis tertentu. Sebanyak kurang lebih 500 mg serat rayon yang telah diiradiasi ditimbang dan dimasukkan ke dalam ampul yang berisi larutan monomer dengan volume tertentu kemudian ditutup rapat. Selanjutnya ke dalam ampul yang berisi serat dialirkan gas N₂ selama 30 menit. Sampel kemudian dipanaskan dalam penangas air yang diatur temperaturnya dan dibiarkan bereaksi selama rentang waktu tertentu. Serat yang telah digrafting dibersihkan dari sisa-sisa monomer dan kopolimernya dengan air panas dan air dingin secara bergantian, kemudian dikeringkan dalam oven.

3. Hasil dan Pembahasan

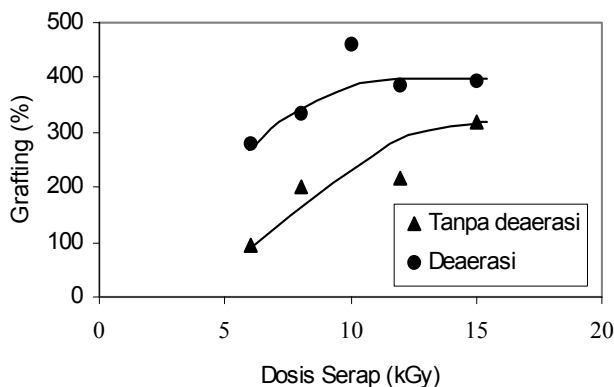
Pengaruh oksigen terlarut dalam air

Gambar 1. menunjukkan penggunaan H₂O yang telah dideaerasi dalam sistem pelarut menaikkan persentase grafting. Proses grafting menggunakan inisiasi peroksida dimana serat rayon diradiasi dahulu dalam media udara, dan proses grafting dilakukan dalam media N₂. Selama reaksi berlangsung, keberadaan oksigen dalam sistem akan menghambat terjadinya reaksi grafting karena oksigen berfungsi sebagai *radikal scavenger*. Oleh sebab itu keberadaan O₂ selama proses perlu diminimalkan. Deaerasi terhadap air adalah

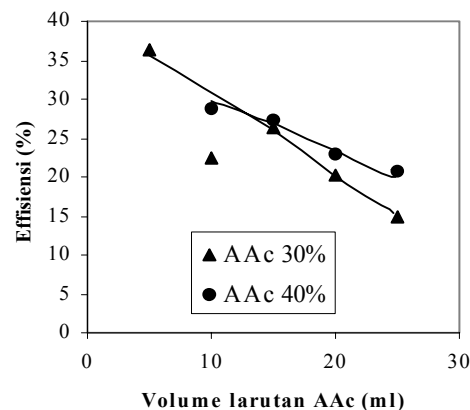
cara yang mudah dan sederhana untuk mereduksi kadar oksigen terlarut (OT). Hasil ini didukung oleh pengukuran kadar OT dengan menggunakan metoda Winkler yang telah dimodifikasi oleh Alsterberg (Alaerts dan Santika, 1987), dimana kadar OT pada pelarut yang belum dideaerasi adalah 5.82 ppm sedangkan pada pelarut yang mengalami deaerasi 4,26 ppm, atau berkurang sekitar 27%. Walaupun pengurangan kadar OT hanya sebesar 27% namun sangat mempengaruhi persentase dan kebolehdajian grafting yang dihasilkan. Pelarut yang digunakan adalah aquades (H₂O) : methanol (90:10), penggunaan methanol menjadi sangat penting karena selain dapat berfungsi sebagai inhibitor untuk mencegah terbentuknya homopolimer yang berlebihan juga berperan membantu membawa monomer ke pusat aktif polimer (Rekso dan Ichsan, 1998).

Pengaruh dosis total dan laju dosis radiasi.

Pengaruh dosis iradiasi total terhadap persen grafting dapat dilihat pada tabel 2. Data ini menunjukkan bahwa kadar pencangkakan meningkat dengan meningkatnya dosis iradiasi total yang diberikan. Pada laju dosis 2,5 kGy/j dan 4 kGy/j, semakin tinggi total dosis iradiasi maka persen grafting semakin besar sampai dosis 12 kGy dan kemudian menurun pada dosis 15 kGy. Pada laju dosis 10 kGy/j; setelah dosis 12 kGy, persen grafting cenderung tetap. Dalam percobaannya Basuki F. membuktikan bahwa semakin tinggi dosis radiasi yang digunakan, radikal bebas yang terbentuk semakin banyak. Sehingga pada dosis yang tinggi kemungkinan radikal bebas melakukan rekombinasi semakin besar (Basuki, 2000). Pada iradiasi dalam media udara, radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan oksigen membentuk diperoksida (POOP) dan hidroperoksida (POOH). Adanya rekombinasi radikal bebas kemungkinan besar akan menyebabkan berkurangnya POOP dan POOH yang terbentuk. Peroksida dibutuhkan untuk menginisiasi proses *grafting*. Penulis beranggapan bahwa persen grafting menjadi tetap atau menurun terjadi karena berkurangnya jumlah peroksida yang terbentuk. Tabel 2. juga memperlihatkan semakin tinggi laju dosis radiasi, kadar pencangkakan yang dihasilkan semakin besar. Rayon adalah selulosa yang sudah mengalami proses secara kimiawi menjadi serat. Jianqin L. dkk melakukan iradiasi terhadap selulosa dengan metoda



Gambar 1. Pengaruh deaerasi H₂O dalam sistem pelarut terhadap persen grafting



Gambar 2. Pengaruh volume larutan AAc terhadap efisiensi grafting

Tabel 2. Pengaruh dosis radiasi terhadap kadar pencangkakan AAc 30 %.

No	Dosis radiasi (kGy)	%grafting LD: 2,5 kGy/j *	%grafting LD: 4 kGy/j	%grafting LD: 10 kGy/j
1	6	45,21	70,15	280,07
2	8	91,14	149,89	336,10
3	10	203,14	224,37	459,89
4	12	327,62	309,29	387,63
5	15	178,08	211,08	394,95

Konsentrasi lar. AAc : 30%, waktu bubling 30 menit, waktu reaksi 60 menit, kecuali * 120 menit, suhu reaksi 45 °

iradiasi awal peroksida, dalam percobaannya ia menyimpulkan bahwa pada saat radiasi dalam media udara, selain radikal bebas yang ada dalam fasa amorfos (berubah menjadi peroksida) dan radikal yang terjebak dalam fasa kristalin, terbentuk pula radikal yang terjebak pada interfas antara daerah kristal dan amorfos. Radikal yang terakhir ini memegang peran yang penting pada saat proses grafting (Jianqin, 1999). Karena rayon memiliki kristalinitas yang tinggi maka semakin kecil laju dosis yang digunakan kemungkinan semakin banyak radikal yang terjebak dalam fasa kristalin semakin besar, hal ini ditunjukkan pula pada gambar 2. dimana kadar pencangkakan yang dihasilkan pada laju dosis 2 kGy/j dan 4 kGy/j tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan laju dosis 10 kGy/j. Pada laju dosis yang tinggi (10 kGy/j) kemungkinan terbentuknya radikal bebas yang terjebak dalam fasa kristalin kecil, sehingga radikal bebas yang berubah menjadi peroksi dan radikal yang terjebak didalam interfas amorfos-kristalin semakin banyak

yang mengakibatkan semakin besar pula persen grafting yang dihasilkan.

Selain besarnya persen grafting, sifat fisik substrat polimerpun harus diperhatikan. Dosis radiasi yang tinggi dapat memicu terjadinya degradasi pada serat rayon, hal ini dibuktikan pada dosis radiasi 12 kGy sifat fisik serat rayon menurun yang ditandai dengan merapuhnya serat. Dosis optimal adalah 10 kGy dengan laju dosis 4 kGy/j, hasil ini yang digunakan untuk proses selanjutnya.

Pengaruh konsentrasi dan volume larutan monomer

Gambar 2. menunjukkan penggunaan larutan AAc 40 % menghasilkan persen grafting yang lebih besar daripada larutan AAc 30%. Efisiensi grafting pada konsentrasi 30% tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan 40%. Meningkatnya konsentrasi monomer menyebabkan meningkatnya difusi monomer ke dalam matriks polimer sehingga probabilitas tumbukan antara molekul monomer dan radikal polimer semakin banyak sehingga persen

grafting meningkat (Chapiro,1962). Persen grafting akan berbanding lurus dengan konsentrasi monomer. Hal ini terjadi bila konsentrasi monomer dalam matriks polimer konstan dan kecepatan propagasi dapat diimbangi dengan kecepatan difusi monomer ke dalam matriks polimer. Soebianto Y.,et all dalam percobaannya menyimpulkan bahwa grafting asam akrilat pada TPX terjadi pada permukaan kemudian monomer asam akrilat berdifusi sedikit demi sedikit ke dalam matriks TPX, difusi terjadi karena permukaan yang sebelumnya bersifat hidrofobik berubah menjadi hidrofilik sehingga memudahkan monomer masuk ke dalamnya (Soebianto,1987).

Persen Efisiensi dan persen homopolimer diperoleh dari rumus sebagai berikut:

$$\text{Efisiensi (\%)} = \frac{\text{Berat monomer yang tergrafting}}{\text{Berat monomer yang direaksikan}} \times 100\%$$

$$\text{Homopolimer (\%)} = 100 - \% \text{Efisiensi}$$

Dengan berat rayon yang konstan, volume dan konsentrasi larutan AAc yang ditambahkan sangat mempengaruhi efisiensi dan besarnya grafting. Pada konsentrasi yang sama, peningkatan volume larutan AAc yang digunakan diikuti dengan membesarnya rasio berat monomer AAc terhadap berat rayon sehingga difusinya kedalam serat semakin besar, hal ini mengakibatkan semakin tingginya persen grafting. Meningkatnya persen grafting, yang diikuti dengan menurunnya efisiensi menunjukkan monomer yang ditambahkan lebih banyak terkonversi menjadi homopolimer dibandingkan dengan grafting. Sehingga penambahan volume yang berarti peningkatan rasio monomer AAc terhadap serat rayon tidak menyebabkan proses berjalan lebih efisien walaupun kadar pencangkakan bertambah.

Dari pengamatan secara visual tampak bahwa semakin tinggi persen grafting; fisik serat tampak semakin rapuh. Pada kadar pencangkakan sampai ± 200 % serat rayon masih terlihat memiliki sifat fisik yang baik.

Pengaruh temperatur dan waktu reaksi.

Persen grafting yang tertinggi dihasilkan pada temperatur 45°C dan kemudian berlangsung

tetap dan menurun pada temperatur 75°C(gambar tidak ditampilkan). Kenaikan temperatur meningkatkan mobilitas monomer menuju pusat aktif dan meningkatkan derajat pengembangan matrik polimer sehingga laju difusi monomer ke dalam matriks polimer yang mengandung pusat aktif (radikal terjebak) meningkat, yang berarti meningkat pula laju grafting awal⁵. Pada suhu yang relatif rendah (35 °C), mobilitas monomer kurang sehingga monomer yang bertumbukan dengan radikal bebas yang ada dalam matriks polimer juga menjadi sedikit, sedangkan pada temperatur yang terlampau tinggi (75°C), monomer cenderung saling bertumbukan sebelum berdifusi kedalam matrik polimer sehingga mempercepat terminasi.

Persen grafting bertambah dengan bertambahnya waktu yang digunakan untuk grafting tapi berlangsung optimal pada waktu 45 menit (gambar tidak ditampilkan). Dengan bertambahnya waktu reaksi, difusi monomer ke dalam polimer akan semakin banyak tetapi viskositas monomer menjadi lebih kental. Sehingga setelah bereaksi selama 45 menit monomer semakin sulit mencapai pusat aktif (radikal) dan efisiensi grafting mencapai nilai optimal.

4. Kesimpulan

1. Deaerasi awal terhadap pelarut air dapat menurunkan kadar oksigen terlarut sampai dengan 27% dan menaikkan persentase grafting sebanyak 24% – 68%, serta meningkatkan kebolehdjian *grafting* yang dihasilkan.
2. Persentase *grafting* meningkat dengan meningkatnya laju dosis serta meningkatnya total dosis sampai batas tertentu.
3. Penambahan volume atau peningkatan rasio monomer AAc terhadap rayon tidak menyebabkan proses berjalan lebih efisien walaupun persentase *grafting* meningkat.
4. Temperatur dan waktu optimal proses *grafting* adalah 45°C dan 45 menit.

6. Daftar Pustaka

- Alaerts G., Santika S.S., (1987). *Metoda Penelitian Air*, Usaha Nasional, Surabaya, Indonesia, hal. 159-183
- Basuki F. (2000). *Sintesis dan Karakterisasi Kopolimer Grafting Radiasi Asam Akrilat, Akrlamida dan Campurannya pada Serat Rayon*

Tita Puspitasari, Yanti Sabarinah Soebianto dan Endang Asijati Ichsan

sebagai Penukar Ion . Thesis Magister, Jurusan Kimia, Universitas Indonesia.

Chapiro A. (1962). Radiation Chemistry of Polymeric Systems, John Wiley&Sons, New York.
Jianqin Liu, Maolin Zhai, Hongfei Ha, (1999). Pre-irradiation Grafting of Temperature Sensitive Hydrogel on Cotton Cellulose Fabric, Radiation Physics and Chemistry 55. 55-59.

Rekso G.T., Ichsan E.A. (1998). Radiation Graft Copolymer of Acrylamide onto Polypropylene Fibers for Metal Uptake . Radiation Technology for Conservation of The Environment. IAEA-TECDOC-1023 . 585-594.

Soebianto Y., Yoshii F., Makuuchi K., Ishigaki I., (1987). Radiation Grafting of Hydrophilic Monomers onto Poly(4-Methylpentene-1), I . Die Angewandte Makromolekulare Chemie 149. 87-99.

Pemetaan air masin dengan teknik geokimia air tanah di sekitar kolam ternakan udang harimau, Kerpan Kedah

Umar Hamzah

Program Geologi
Pusat Pengajian Sains Sekitaran & Sumber Alam
Fakulti Sains & Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, Malaysia
e-mail: aiman9@yahoo.com

Abstrak

Analisis air yang diekstrak dari tanah telah dilakukan terhadap 85 sampel tanah yang dipungut secara grid di kawasan ternakan udang harimau di Kerpan. Sampel tanah diauger pada kedalaman 2m bermula dari garis pantai sehingga 20 km ke arah daratan. Dengan analisis geokimia air telah diperolehi kepekatan beberapa anion dan kation seperti Kalium, Natrium, Kalsium, klorida, sulfat dan bikarbonat disamping jumlah pepejal terlarut. Hasil analisis kepekatan pepejal terlarut menunjukkan sempadan air masin adalah di sekitar 1 km dari tepi laut manakala mengikut analisis kepekatan klorida, sempadan tersebut terletak dalam lingkungan 4-6 km. Bentuk sempadan zon air masin pada peta kepekatan klorida dan Kalsium menunjukkan kemasinan tersebut dipengaruhi terutamanya oleh faktor infiltrasi daripada kolam ternakan udang dan terusan yang bersambung daripada laut ke dalam kawasan kajian.

1. Pendahuluan

Soed (2002) dan Mustafa (2002) telah melaporkan bahawa kawasan Kerpan terutama di bahagian yang dijalan ternakan udang harimau (Rajah 1) telah mengalami intrusi dan infiltrasi air masin samada secara langsung dari laut atau dari kolam ternakan itu sendiri. Penemuan tersebut telah mereka perolehi hasil daripada analisis air beberapa sampel daripada lubang gerudi di kawasan kajian disokong oleh survei keberintangan geoelektrik menegak dan survei keberintangan 2-D. Untuk melihat kesan kemasukan air masin di kawasan kajian secara menyeluruh, pensampelan secara bergrid sebesar 1-1.5 km telah dibuat bermula daripada tepi pantai hingga 20 km ke arah pendalaman oleh Yeu (2003). Hasil penemuan oleh beliau dimuatkan dalam kertas kerja ini. Kajian kemasinan terutama di kawasan dataran pantai dan yang bersungai dengan teknik analisis geokimia air memang telah banyak dilakukan oleh pengkaji-pengkaji seperti Hamzah *et al.* (2002) dan Samsudin *et al.* (1997) yang telah

menjalankan kajian di pantai timur Semenanjung Malaysia. Manakala Sapari dan Awang (1996) telah melaporkan kajian hidrogeologi secara menyeluruh termasuk analisis air bawah tanah di kawasan pantai barat Malaysia. Kajian tersebut di atas melibatkan penyiasatan kemasukan air laut ke arah daratan akibat daripada pengepam berlebihan air bawah tanah untuk penggunaan secara domestik di kawasan perindustrian dan perladangan yang terletak di pinggir pantai.

2. Percobaan

Pensampelan tanah dilakukan secara sistematik dengan menggunakan kaedah pengridan segiempat sama di kawasan kajian. Pensampelan tersebut dilakukan di sepanjang tujuh garis rintisan bermula daripada tepi pantai sejauh 20 km ke arah pendalaman (Rajah 2). Jumlah sampel yang dikutip ialah 85 dengan jarak pensampelan purata 1.5 km. Kodinit pensampelan dicatakan dengan alat sistem penentuan kedudukan global (Global

positioning system). Sampel tanah diambil menggunakan auger tangan dari kedalaman 1.5-2.0 m. Sampel tersebut seterusnya dikeringkan di makmal selama beberapa hari pada suhu bilik. Setelah kering, sampel tanah tersebut dihancurkan dengan lesung tangan dan pengetuk yang dibuat daripada plastik. Tanah yang telah dihancurkan diayak dengan pengayak bersaiz 355 μm . Serbuk hasil ayakan dicampur dengan air suling sehingga tepu dan diisi ke dalam botol kedap udara selama 24 jam. Untuk mengekstrak air daripada tanah, kuantiti sampel serbuk yang diperlukan ialah 300 gram untuk dicampurkan dengan air suling sebelum diekstrak. Air yang diekstrak kemudiannya dianalisis dengan bantuan peralatan makmal menurut prosedur konvensional. Jumlah pepejal terlarut ditentukan dengan alat konduktiviti/TDS manakala alat Spectrophotometer UV-100-01 digunakan untuk menganalisis kepekatan klorida dan sulfat. Alat Spektrometer serapan atom (AAS) pula digunakan untuk menghitung kepekatan Kalsium dan Magnesium manakala alat Fotometer Nyalaan Api (FP) digunakan untuk menganalisis Kalium dan Natrium. Penentuan Bikarbonat dibuat melalui teknik penitratan.

3. Hasil dan pembahasan

Rajah 3 menunjukkan taburan unsur-unsur Kalsium, Kalium, Magnesium dan Natrium di sepanjang garis rintisan daripada tepi laut hingga ke bahagian pendalaman. Kecuali unsur Magnesium, taburan unsur-unsur lain menunjukkan trend pertambahan kepekatan ke arah laut dan pengurangan kepekatan ke arah pendalaman. Lengkung taburan Kalium dan Natrium menunjukkan trend yang hampir sama iaitu peningkatan kepekatan secara mendadak pada kedudukan lokasi kurang daripada 2 km dari pantai. Pada jarak ini kepekatan Natrium dan Kalium masing-masing dalam lingkungan 1000-3000 mg/l dan 100-600 mg/l. Berdasarkan Davies dan DeWiast (1966), nilai Natrium dan Kalium air laut ialah disekitar 10560 mg/l dan 380 mg/l. Oleh itu dapat disimpulkan bahawa kawasan yang berjarak kurang daripada 2 km daripada pantai besar kemungkinan telah mengalami penerobosan atau infiltrasi air laut. Manakala lengkung taburan Kalsium menunjukkan peningkatan kepekatan dari pantai sehingga 6 kilometer ke daratan dengan nilai maksimum di

sekitar 650 mg/l. Berdasarkan Davies dan DeWiast (1966) juga, kepekatan Kalsium dalam air laut ialah 400 mg/l. Oleh kerana unsur Kalsium boleh juga disumbangkan daripada sisa-sisa cangkang hidupan laut yang berada dalam lempung lautan kuno yang dianggarkan menganjur dari 6-8 kilometer dari pantai ke pendalaman, taburan lengkung Kalsium tidak boleh digunakan untuk menentukan kadar intrusi dan larut lesap air laut moden. Taburan Magnesium tidak menunjukkan sebarang tren dan purata nilai maksimum hanya disekitar 200 mg/l. Nilai ini adalah agak jauh berbanding dengan jumlah kandungan Magnesium dalam air laut iaitu disekitar 1272 mg/l. Rajah 4 menunjukkan peta taburan kepekatan unsur-unsur Kalium, Natrium, Kalsium dan Magnesium di kawasan kajian yang menunjukkan tren tipikal pengaruh air laut dan lempung samudera. Kepekatan bertambah besar di kawasan yang berhampiran dengan pantai.

Laporan yang diberikan dalam WHO (1971) menyatakan bahawa kandungan Klorida boleh wujud dalam tanah oleh proses luluhawa batu dasar, resapan bahan evaporit, infiltrasi air laut, penyejatan air laut, pembuangan air daripada sektor perindustrian dan kebocoran salur pembuangan. Berdasarkan nilai Klorida juga air boleh dikelaskan kepada air tawar, air payau dan air masin dimana air tawar mengandungi Klorida kurang dari 250 mg/l manakala air masin menunjukkan nilai Klorida melebihi 1000 mg/l. Cerapan yang dilakukan menunjukkan sampel-sampel yang diperolehi dalam jarak 3 kilometer ke arah pantai menunjukkan nilai kepekatan Klorida melebihi 1000 mg/l. iaitu termasuk dalam kategori zon air masin (Rajah 5). Sampel yang diambil dari lokaliti yang lebih jauh dari 3 kilometer termasuk dalam kategori payau dan tawar. Sumber kemasinan dianggarkan daripada intrusi dan sejatan air laut yang berhampiran. Oleh kerana kontur kepekatan klorida yang bernilai 1000 mg/L tidak berbentuk selari dengan pantai tetapi berbentuk memanjang kearah daratan, ada kemungkinan faktor kemasinan disumbangkan oleh kolam ternakan udang yang menggunakan air laut. Air laut akan meresap di sekitar kolam tersebut dan masuk ke dalam lempung serta menambahkan kemasinan lempung tersebut. Fenomena ini tidak kelihatan pada peta taburan anion yang lain. Lengkung sulfat pula menunjukkan pola

yang berlawanan berbanding dengan Klorida dimana penambahan kepekatan dicerap di kawasan yang jauh daripada pantai. Kepekatan di kawasan berhampiran pantai hanya disekitar 1000-2000 mg/l dan meningkat menjadi lebih besar dari 10000 mg/l pada jarak 8 kilometer dari pantai. Pertambahan kepekatan sulfat di kawasan pendalaman mungkin dipengaruhi oleh aktiviti pembajaan dalam pertanian. Lengkung taburan Bikarbonat tidak menunjukkan sebarang tren dan berkepekatan dalam julat diantara 0-400 mg/l. Kepekatan Bikarbonat besar kemungkinan disumbangkan oleh batu dasar di kawasan kajian yang terdiri daripada batu kapur. Rajah 6 menunjukkan peta taburan Klorida, Sulfat dan Bikarbonat di kawasan kajian dimana zon air masin, payau dan tawar dapat dikategorikan dengan baik berdasarkan peta Klorida. Peta Bikarbonat tidak menunjukkan sebarang tren manakala peta taburan Sulfat juga tidak boleh digunakan untuk pengezonan kemasinan air tanah.

Pentafsiran yang dibuat mengenai cerapan kepekatan pepejal terlarut dalam sampel air tanah di kawasan kajian dibuat berdasarkan pengelasan Davies dan DeWiast (1966) dan Philbert (1982). Air masin mengandungi kepekatan pepejal terlarut yang berjalat 10000-100000 mg/l manakala air tawar mengandungi kepekatan pepejal terlarut kurang daripada 1000 mg/l. Cerapan analisis menunjukkan kebanyakan rintisan menunjukkan nilai kepekatan yang amat tinggi berhampiran dengan pantai dan berkurang ke arah daratan. Julat nilai kepekatan pepejal terlarut mencapai 43350 mg/l dalam lingkungan 1 kilometer dari pantai. Zon air tawar pula terletak pada jarak 16 kilometer daripada pantai. Rajah 6 menunjukkan taburan zon air masin berdasarkan kepekatan pepejal terlarut dimana zon air masin terletak pada jarak 1 kilometer dari pantai dan air tawar terletak pada jarak 16 kilometer dari pantai.

4. Kesimpulan

Hasil kajian menunjukkan taburan unsur-unsur Kalium, Naterium dan Kalsium mempunyai perkaitan yang rapat dengan air laut dimana kepekatan unsur-unsur tersebut yang teresap dalam sampel lempung menunjukkan tren peningkatan kepekatan ke arah laut. Kepekatan unsur Kalsium yang disukat dalam sampel lempung pula boleh disimpulkan sebagai indikator kepada wujudnya resapan air laut

daripada kolam ternakan udang yang mengepam air laut sebagai media ternakan. Kontur pertambahan kepekatan Kalsium di sekitar kolam membuktikan faktor resapan air laut ke kawasan sekitar kolam. Tren kontur yang sama diperhatikan pada taburan klorida untuk menunjukkan wujudnya resapan air laut menerusi kolam ternakan udang. Kepekatan klorida bertambah di sekeliling kolam ternakan udang. Faktor resapan air laut menerusi kolam ternakan tidak dapat dilihat berdasarkan peta taburan jumlah pepejal terlarut, bikarbonat dan sulfat.

5. Ucapan terima kasih

Setinggi penghargaan diberikan kepada UKM yang telah menyediakan gran penyelidikan untuk pelajar prasiswazah Yong Cheng Yeu yang membolehkan beliau mengumpul dan memproses sampel di lapangan dan makmal.

6. Daftar Pustaka

- Samsudin A.R., Hamzah U., Rafek A.G., Haryono. J., (1997). Salinity mapping of coastal groundwater aquifers using hydrogeochemical and geophysical methods: A case study of North Kelantan. Proceedings of International Symposium on Integrated Coastal & marine Resource Management. Malang, Indonesia. Page 154-160.
- Davies, S.N. and DeWiast, R.J.M., (1966). Hydrogeology. John Wiley & Sons, Inc., New York, hal. 463
- Hamzah U., Samsudin A.R., Mohamad I.C., (2002). Salinity mapping of coastal groundwater aquifer by surface geoelectrical methods: Case studies at Kuala Selangor and Nenasi, Pahang. Proceedings of Malaysian Science & Technology Congress, Symposium A, Johor Bharu. Page 232-243.
- Mustafa M., (2002). Kajian keberintangan geoelektrik dan geokimia di kawasan Kerpan, Sanglang, Kedah, Disertasi sarjana muda, Departemen Geologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.
- Sapari N., Awang M. N., (1996). Alluvial aquifer: A threatened water resource. Prosiding Seminar Geologi dan Sekitaran: Impak dan Pengauditan, hal. 85-104
- Philbert, F.J., (1982). Major ions. Dlm Jon, C.S.N(Ed). Chemical analysis of inorganic constituents of water. Page 69-128. United States of America: CRC Press, Inc.
- Soed S.B., (2002). Kajian geologi dan keberintangan duga dalam geoelektrik di kawasan Kerpan-Ayer Hitam, Jerlun, Kedah. Disertasi

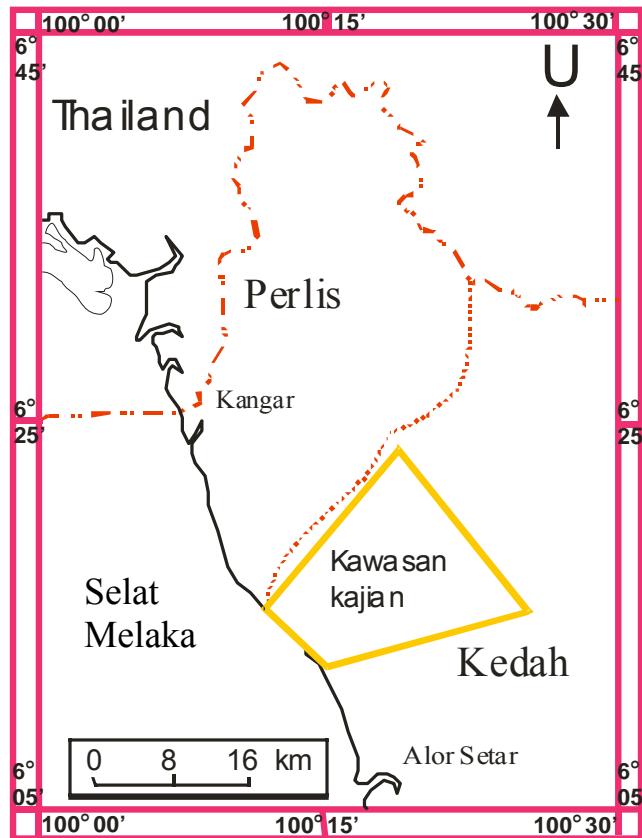
Umar Hamzah

sarjana muda, Departemen Geologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

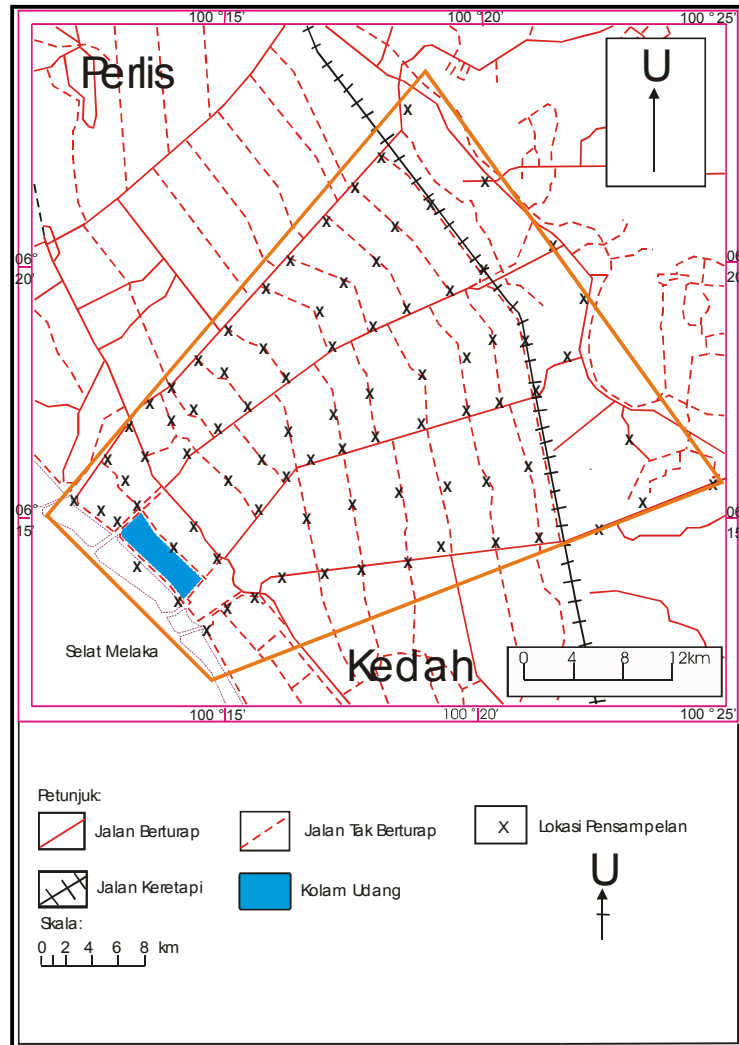
WHO.,(1971). International standards for drinking water. Ed. Ke-3. Geneva: WHO

Yeu, Y. C., (2003). Pemetaan zon air masin, air payau dan air tawar serta pengelasan air tanah dengan kaedah analisis kimia air di kawasan Kerpan, Kedah Darul Aman. Disertasi sarjana muda, Departemen Geologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

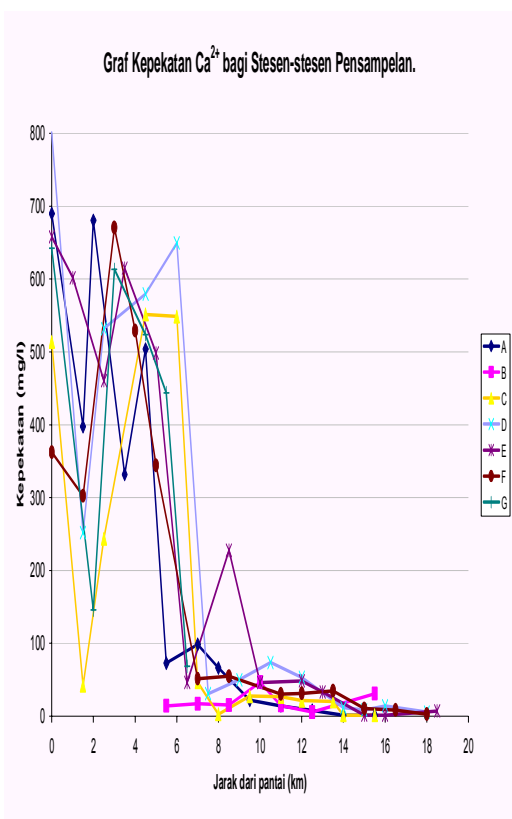
LAMPIRAN



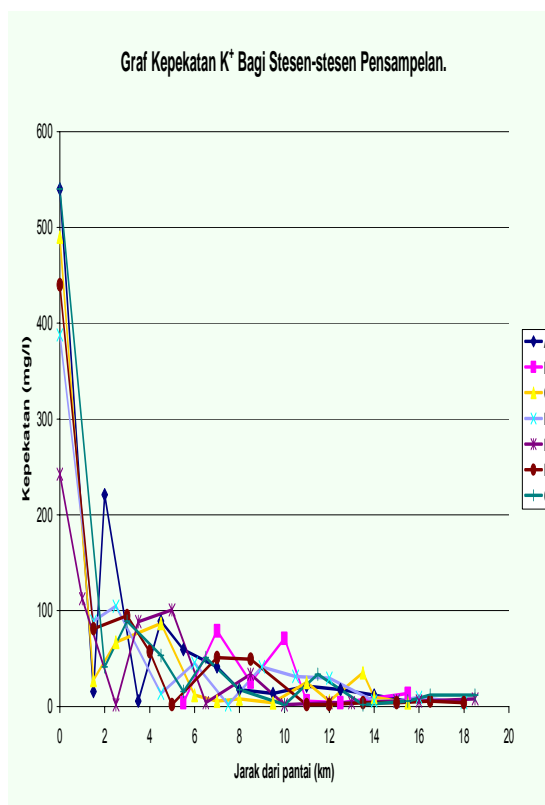
Rajah 1: Peta lokaliti kawasan kajian



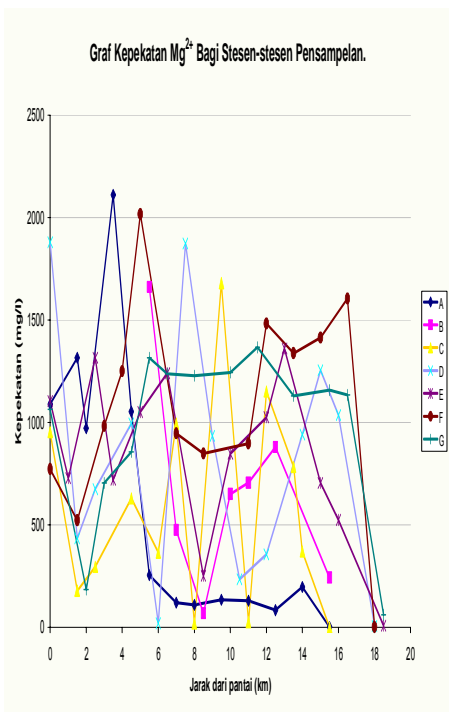
Rajah 2: Peta lokaliti pensampelan dan garis



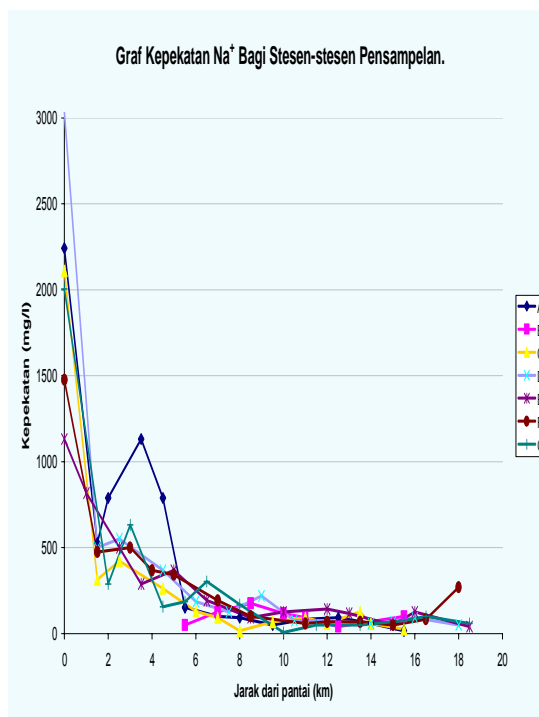
(Ca)



(K)

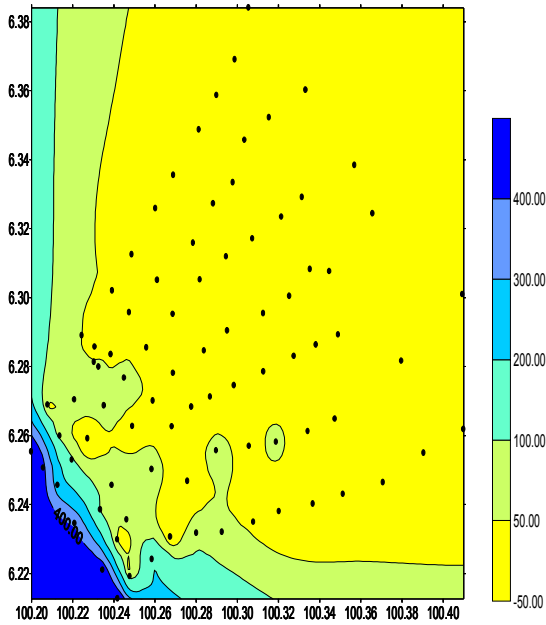


(Mg)

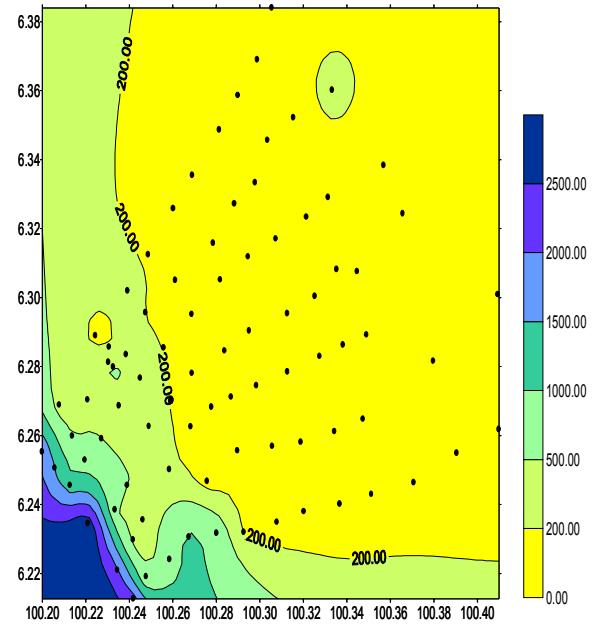


(Na)

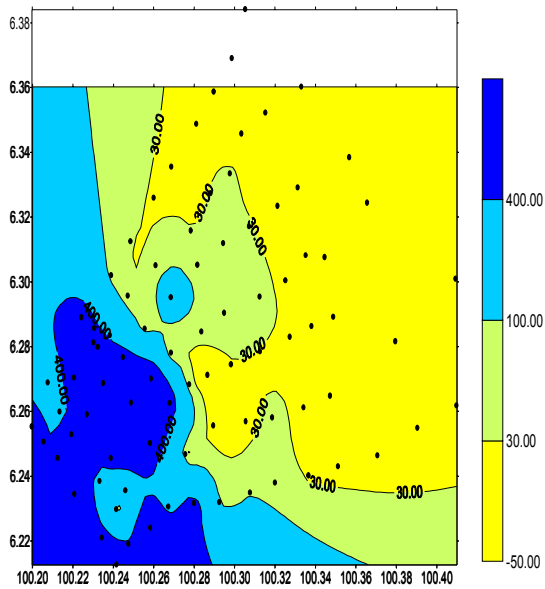
Rajah 3: Taburan unsur-unsur Ca, K, Na dan Mg di sepanjang garis rentasan



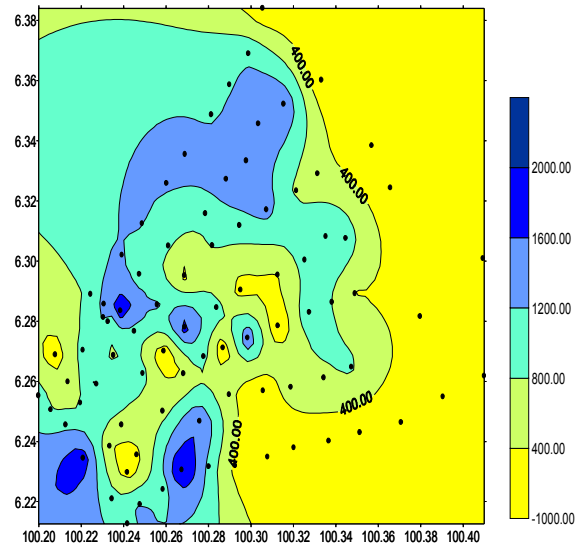
(K)



(Ca)

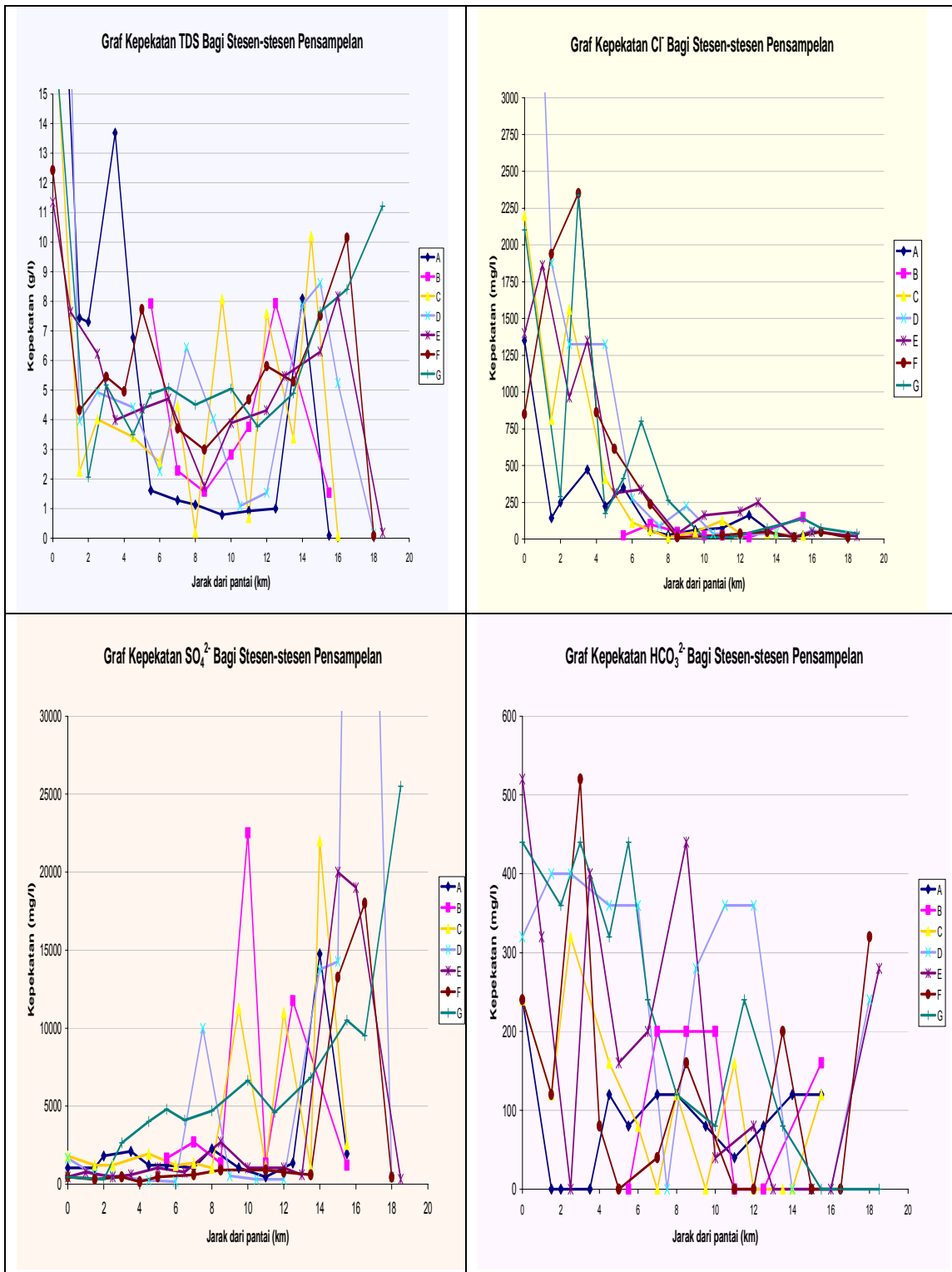


(Na)

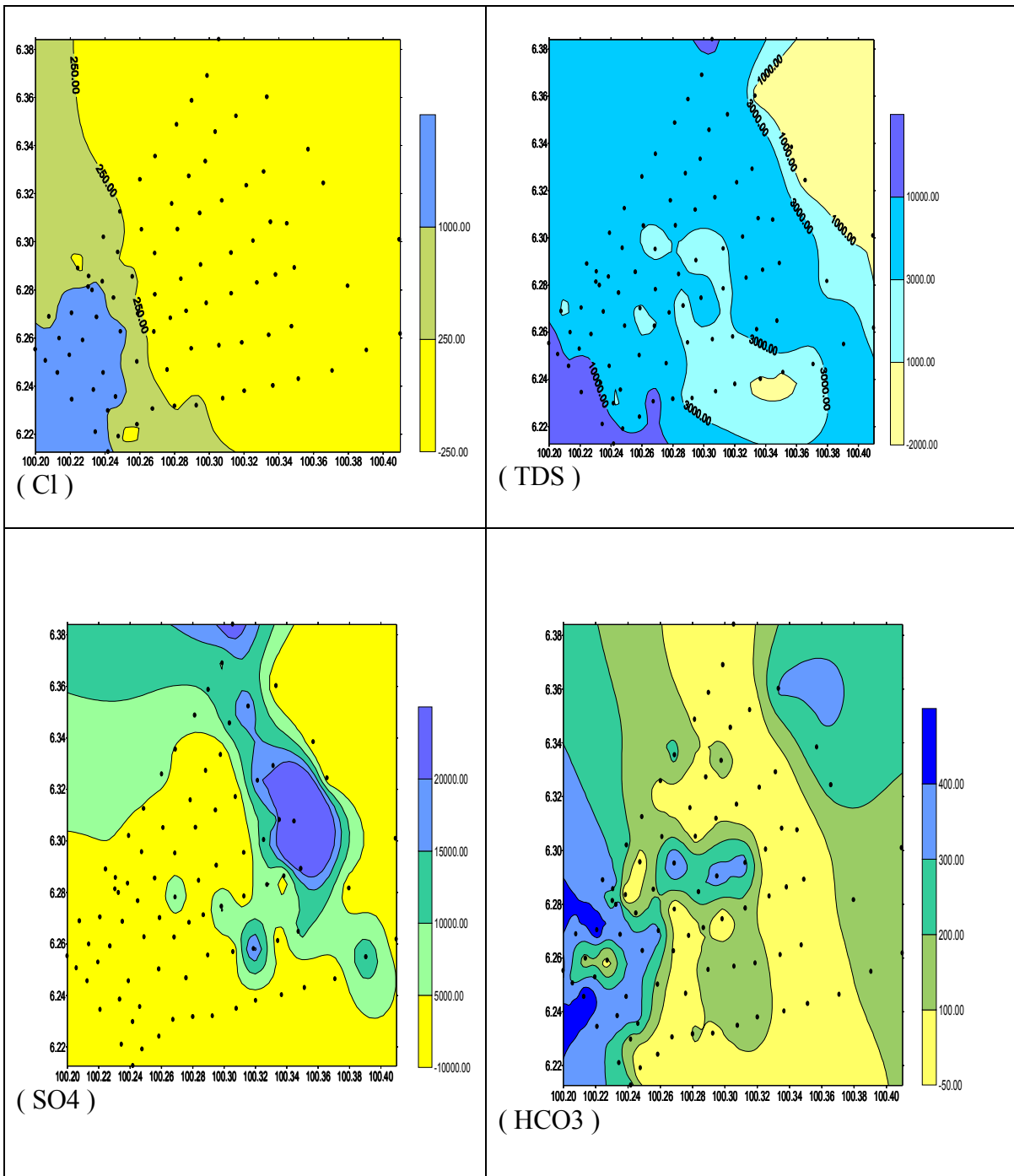


(Mg)

Rajah 4: Peta taburan unsur-unsur K, Ca, Na dan Mg



Rajah 5: Graf taburan klorida, sulfat, pepejal terlarut dan karbonat di kawasan kajian



Rajah 6: Peta taburan klorida, pepejal terlarut, sulfat dan bikarbonat

Corrosion Behavior of Titanium Substrate During Deposition of Manganese Dioxide in Sulphuric Acid Electrolyte

Wahyu Budi Utomo¹⁾, Scott Donne²⁾

1). Chemical Engineering Department, State Polytechnic of Ujungpandang, Makassar
Jalan Perintis Kemerdekaan Km 10, Makassar 90245, Indonesia. poltekup@indosat.net.id or
wahyubutu04@yahoo.com.au

2). Chemistry Discipline, School of Environmental and Chemical Sciences, The University of Newcastle,
Australia. Schott.Donne@newcastle.edu.au

Abstract

Titanium has many important practical applications. In this work our focus is on its application in the battery industry where it is used almost universally as the anodic substrate for the deposition of electrolytic manganese dioxide. The corrosion of titanium and the effect of Mn^{2+} ions (0.001-1.0 M) in different concentration sulfuric acid solutions (0.001-1.0 M) at temperatures ranging from ambient to 98 °C have been studied using potentiodynamic polarization techniques. Titanium showed voltage regions of active corrosion and passive behaviour in different acid concentrations at different temperatures. It was also found that the active corrosion of titanium to form titanium dioxide occurs at low potential (-0.8 to -0.4 V vs SCE) and is strongly dependent on the sulfuric acid concentration and temperature. Passivation occurs at potentials more positive than the active corrosion range, before oxide breakdown at potentials above ~2 V depending on the electrolyte concentration. The corrosion current of titanium increases with an increase in acid concentration and temperature for acid concentrations of 0.1 M and higher. Increasing acid concentration is also found to shift the breakdown potential of titanium dioxide layer toward more positive values, but increasing temperature does not affect this value. The presence of Mn^{2+} ions were found to decrease the corrosion current density at all temperatures. MnO_2 is deposited on titanium at lower potentials compared to oxygen evolution, and the deposition current density of MnO_2 correlates with Mn^{2+} concentrations.

Keywords : Corrosion, deposition, titanium

1. Introduction

The electrochemical behaviour of titanium has been the subject of numerous investigations. Most of them were focused on the active-passive transition behaviour and the oxide growth characteristics in various environments. In an oxidizing environment, Ti readily forms a passive oxide film that is non-conducting. The passivation layer formed in the first polarization cycle at anodic potentials did not block the cathodic process at potentials below -0.7 V, including the semiconducting nature of the oxide passivation layer. Anodic current flowing at potentials above 0.7 V is the transpassive current for oxygen evolution

(Prescic. *et al.*, 2000). Low anodic passive current is independent of potential and anion, but partly dependent on pH. Titanium surfaces always carries a net negative charge that results in its inertness to solution anion (Hurlent *et al.*, 1986).

Titanium has both an active state at low electrode potentials and a passive state at higher potential. In the active region, titanium metal undergoes dissolution to form Ti^{3+} in solution, while in the passive region Ti^{3+} ions are oxidized to Ti^{4+} (TiO_2) with the reaction being first order with respect to the concentration of Ti^{3+} (Hurlent *et al.*, 1986). In its passive state, no titanium metal dissolution

occurs. An investigation on titanium dissolution (Caprani et al., 1982) has studied the interactions between oxygen reduction and titanium dissolution in aerated hydrochloric acid. The presence of dissolved O₂ inhibits the anodic dissolution of Ti, predominantly in the active region. The reduction rate of O₂ is partially limited by its diffusion to the electrode surface and potential. Mixed kinetics for this reduction reaction was observed in the active region and a pure diffusional one in the near passivity region.

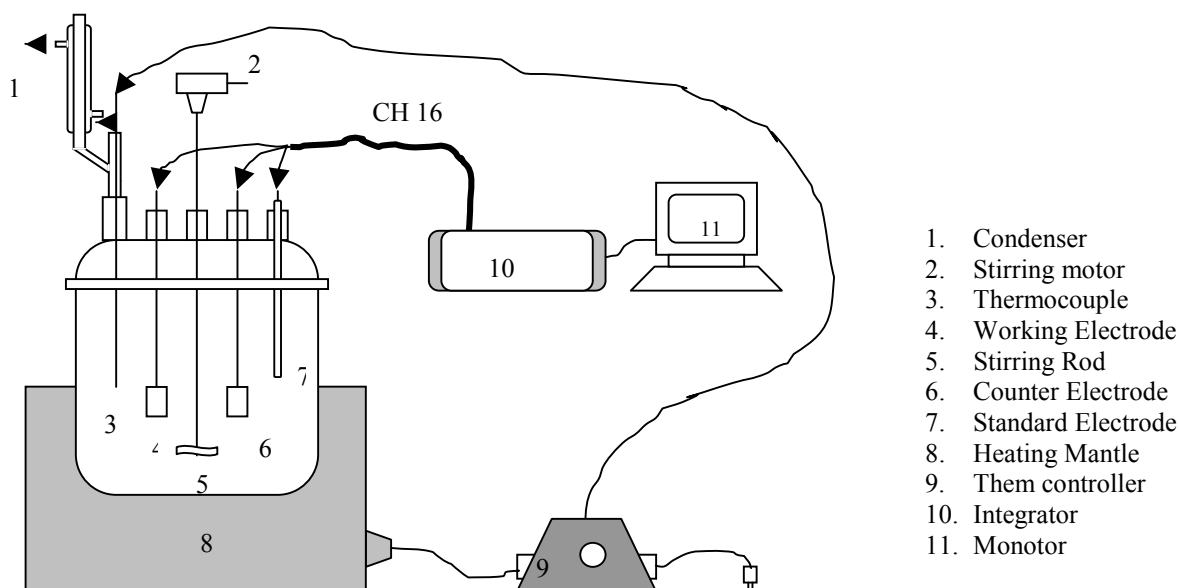
The best conditions for the Ti anode for EMD production were found to be at a relatively low current density and the best method for preventing Ti corrosion during EMD deposition is by coating of the electrode surface with β-MnO₂ (Kalinovskii et al., 1988). In relations to electrolyte composition and maximum current density in sulfate solutions during EMD deposition, the maximum deposition current density was found to be approximately 115 A/m² at the highest molar ratio of 0.9 (Fisher et al., 1985). Another study on titanium anode for EMD production in neutral solutions found that the potential of the titanium anode during electrodeposition of the manganese dioxide in neutral solutions is less than that in acidic solutions (Tsagareli et al., 2000). Under such conditions no oxygen evolution was observed, hence there are favorable conditions for the titanium electrode to work without passivation. Passivation of the titanium surface did not actually take place in the neutral solution, however the voltage during electrolysis

increased. The reason for this was the formation of a high resistance manganese compound layer on the cathode surface.

Suppressing the passivation of the Ti anode during electrolytic production of EMD is the primary concern in EMD manufacturing, because the cell voltage would rise steeply until the passage current was stopped (Mriyaaki et al., 1998). Another feasible means to prevent this failure was to adjust the MnSO₄-H₂SO₄ composition, but there is no information on a clear, safe region of electrolyte composition for preventing Ti passivation. A sufficient supply of MnSO₄ component to the electrolyte mixture is essential to maintain the Ti anode sound and non-passivated. The present work is aimed at investigating the corrosion behavior of titanium substrate during electrodeposition of manganese dioxide in different sulphuric acid concentrations and temperature. The corrosion behavior during deposition will be compared to to the background of titanium in sulphuric acid without Mn(II) ions. The effect of Mn(II) ions concentrations on the corrosion behavior and the deposition of manganese dioxide will also be investigated.

2. Experimental

Potentiodynamic measurement were carried out in an electrochemical cell consisted of 1 cm² titanium working electrode, platinum sheet counter electrode and standard calomel electrode. A multi channel Perkin Elmer potentiostat was used to run the measurement. Titanium working electrode was mechanically polished with abrasive paper, washed with



double de-ionized water and scanned in negative direction at 100 mA for 5 minutes. It was then rinsed with water, acetone and water then dried at room temperature before placed in the test cell. The scan was started from OCV for 10 minute followed by negative potentiodynamic scan (-10mV/s) down to -0.8 V and potentiostatic steps in positive direction. 250 potentiostatic steps were applied, where each step was 25mV with 60 seconds static time. The steady state current in each potentiostatic steps was then extracted to construct overall voltammogram. The effect of acid concentration (0.001-1M) on the corrosion of titanium was studied as a function of

temperature (20, 40, 60, 80 and 98°C). The effect of Mn(IV) ions concentrations was studied in 1M H₂SO₄ solutions with the identical procedures.

3. Results and Discussion

Figures 1-4 show the polarization curves of manganese deposition on titanium in different sulphuric acid concentrations and temperatures. The electrolyte consisted of H₂SO₄ prepared with identical procedures as those run for titanium background to be able for the polarization curves to be compared, and 0.02M Mn(II) was added. It has been observed that the background curves of titanium in sulphuric

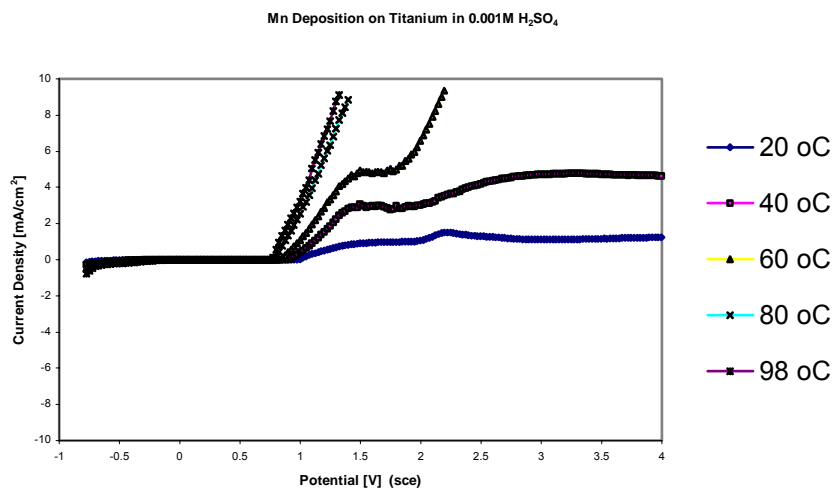


Fig 1. MnO₂ deposition on titanium in 0.001M H₂SO₄ at different temperatures Mn(II) = 0.02M

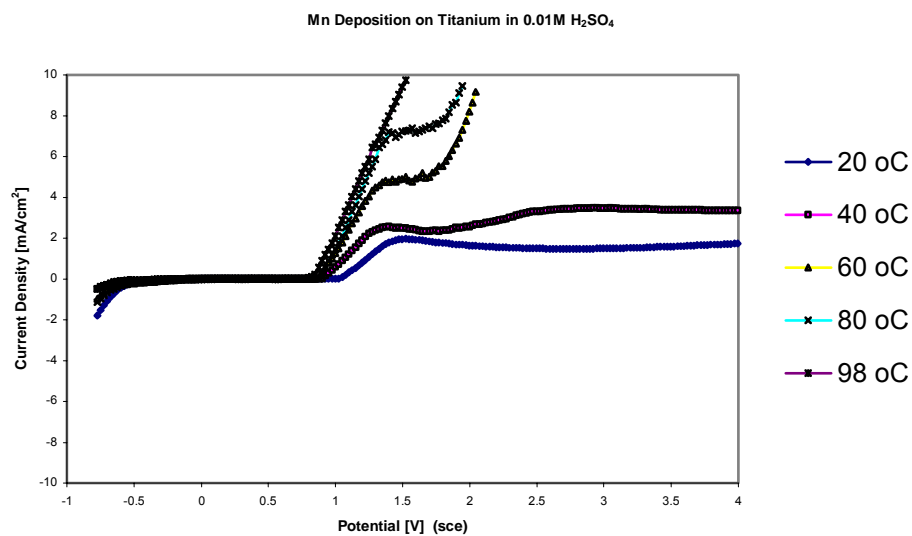


Fig 2. MnO₂ deposition on Titanium in 0.01M H₂SO₄ at different Temperatures. Mn(II) = 0.02M

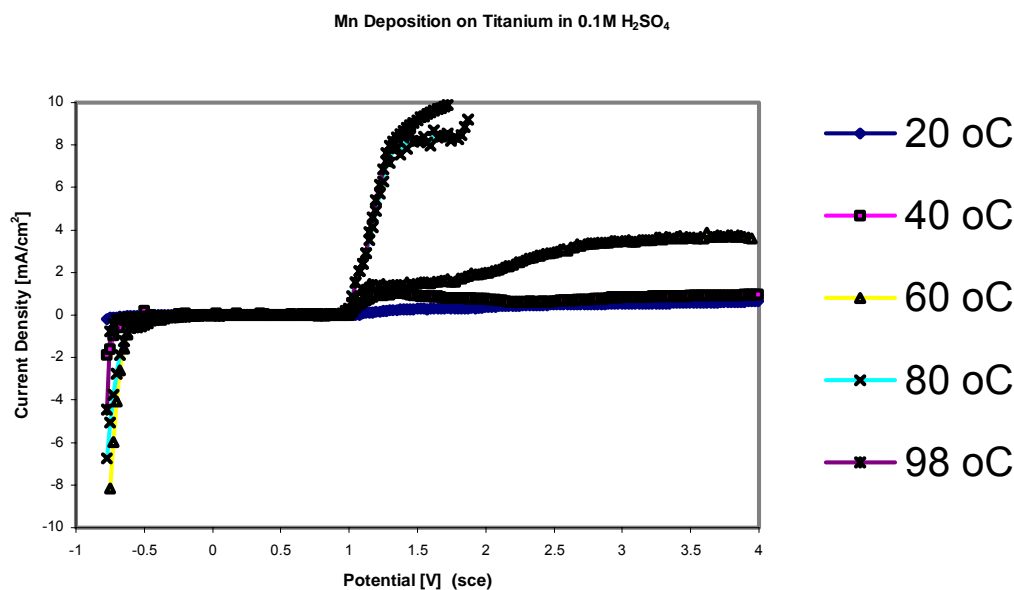


Fig 3. MnO₂ deposition on Titanium in 0.1M H₂SO₄ at different Temperatures. Mn(II) = 0.02M

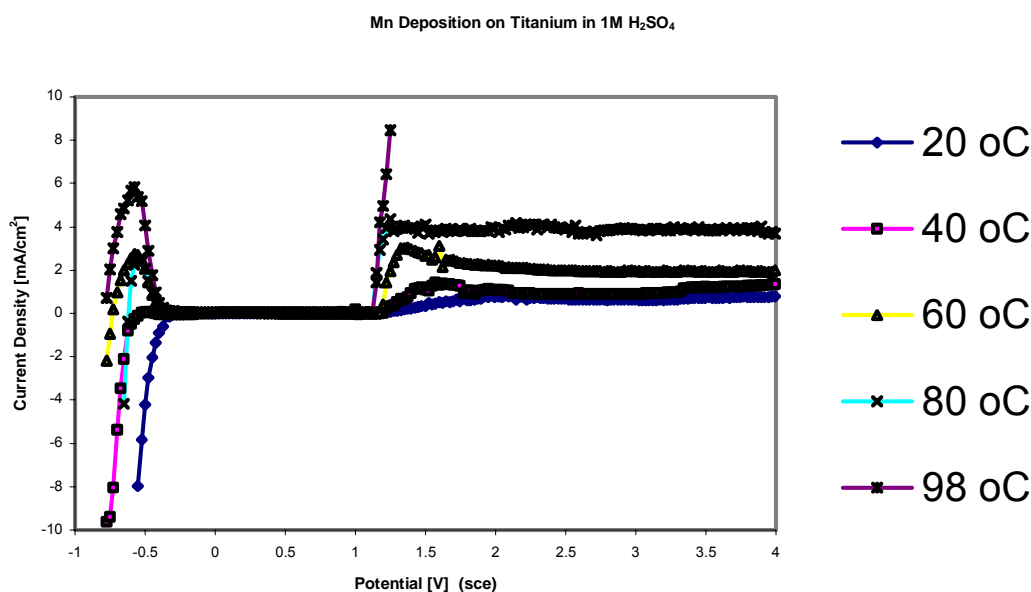


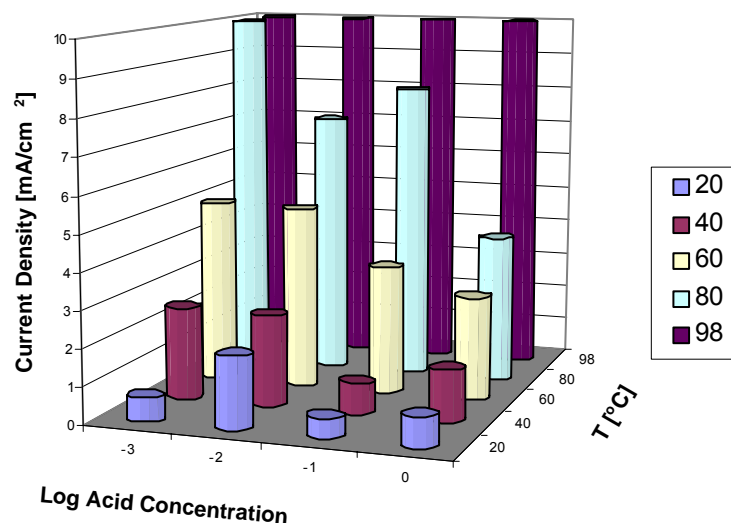
Fig 4. MnO₂ deposition on Titanium in 1M H₂SO₄ at different Temperatures. Mn(II) = 0.02M

acid concentration higher than 0.1M titanium undergoes surface activation and passivation at low potential between -0.8 to -0.45 volts (sce).

It can be seen from fig 1 that there were no increase in current density at the active-passive potential region of titanium between -0.8-0.45 volts (sce) as it was observed in the background curve of titanium. Mn(II) ions in low acid

concentration has no effect on titanium active-passive behaviour. Manganese dioxide deposition in this low acid concentration at room temperature began at 1 volt (sce) and increased to 1 mA/cm² before it was constant at that value at 1.5 volts.

The second increase in current density was observed at about 2 volts before it decrease and

Deposition Current density of MnO₂ on Titanium in 1M H₂SO₄Fig 5. Deposition Current Density of MnO₂ on Titanium in 1M H₂SO₄

finally constant. Identical pattern were observed in 40°C where there were two increases in current density at the same potentials and two regions of constant current were observed. Two increases and one regions of constant current density were observed at 60°C and only one increase at 80 and 98°C. These two regions of increase and constant current density suggests that there were two mechanisms or two species involved in the process of manganese dioxide deposition as it was suggested by a number of workers (Jerkewics *et al.*, 2004 and Rodrigues *et al.*, 1988).

In a study on the electrochemical behaviour of manganese dioxide on gold electrode, Rogulski *et al.* (2003) found two positive peaks of manganese species oxidation in 0.5M H₂SO₄ and Mn(II) concentration lower than 0.1M with scan rate 2.5 mV/s. He stated that oxidation of Mn(II) to MnO₂ involves multi steps reaction as proposed earlier by Chartwright that the reactions involve slow diffusion of Mn²⁺ from bulk solution to the electrode surface followed by fast formation of Mn³⁺ leading to the formation of the insulating MnOOH layer on the surface of electrode. He consider that the rate determining step is the diffusion of Mn²⁺ from bulk to the surface and the two reactions leading to the formation of insulating layer is a single fast step. The

MnOOH formed in the chemical step is then oxidized to form MnO₂ at higher potential.

The same shape of curves was found in 0.01M sulphuric acids at all temperatures (fig 3) as it was found in 0.001M indicating that the same reactions occurred at this concentration. There was no active-passive peak current density observed in 0.01M at potential range -0.8 to -0.45 volts of all temperatures. Two increases of current density were observed at 40, 60 and 80°C while the corresponding constant current density regions were lower than those found in 0.001M acids. It suggests that increase in the acid concentration have reduced the rate of MnO₂ deposition that is probably due to the increase in passive layer formed on the surface of titanium substrate although no passivation current density seen at low potential region. Further decrease in deposition current density was found with increasing acid concentration of up to 1 M (fig 3-4) and the second oxidation peak current density disappeared.

Fig 6 and 7 show the peak corrosion current density of titanium in H₂SO₄ alone as background and in H₂SO₄ containing Mn(II) ions at constant concentration of 0.02M respectively. In H₂SO₄ (fig 6) the corrosion current density of Ti started to occur in 0.1M at 60°C and it increased with the increase of temperature. It further increased as the acid

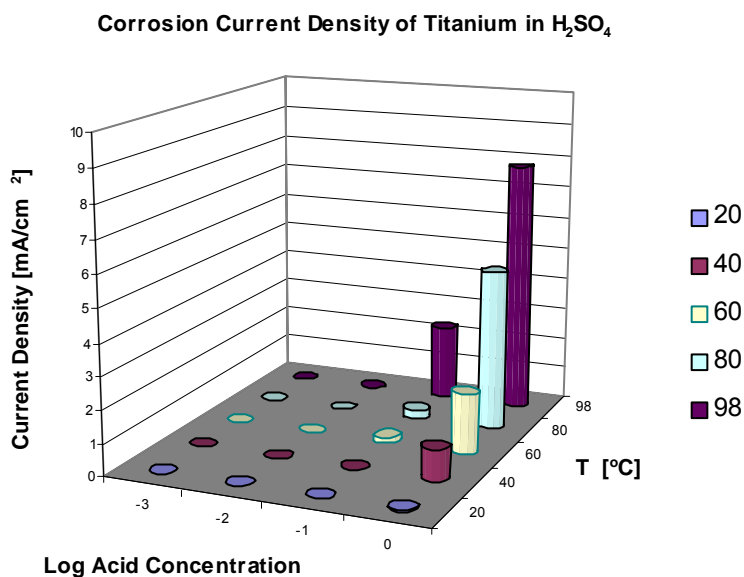


Fig 6. Corrosion Current Density of Titanium in H₂SO₄

Corrosion Current Density of Titanium at the MnO₂ Deposition in 1M H₂SO₄ + 0.02M MnSO₄

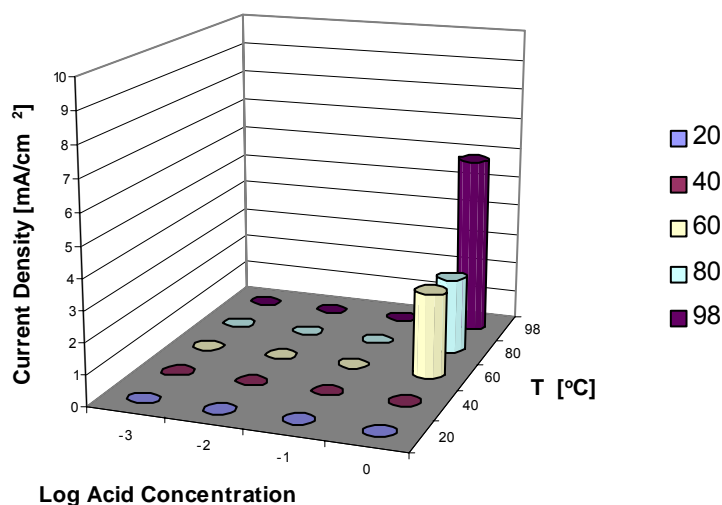


Fig 7. Corrosion Current Density of Titanium in H₂SO₄ + MnSO₄

concentration was increased to 1M at all temperatures. It is clear that acid concentration and temperature increases corrosion current of titanium in H₂SO₄ proportionally. When the Mn(II) ions added into the acid, the corrosion current in 0.1M acid was totally disappeared even at 80 and 98°C. The presence of Mn(II) ions in the solution have probably caused that

disappearance. One possible factor responsible is the Mn(II) ions adsorbed on the surface of the substrate that cover the surface and prevent the passage of electron. The corrosion current increased when the acid concentration was increased to 1M, but they were lower than those in H₂SO₄ without Mn(II) ions. It is clear that the presence of Mn(II) in the acid has

Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 40°C

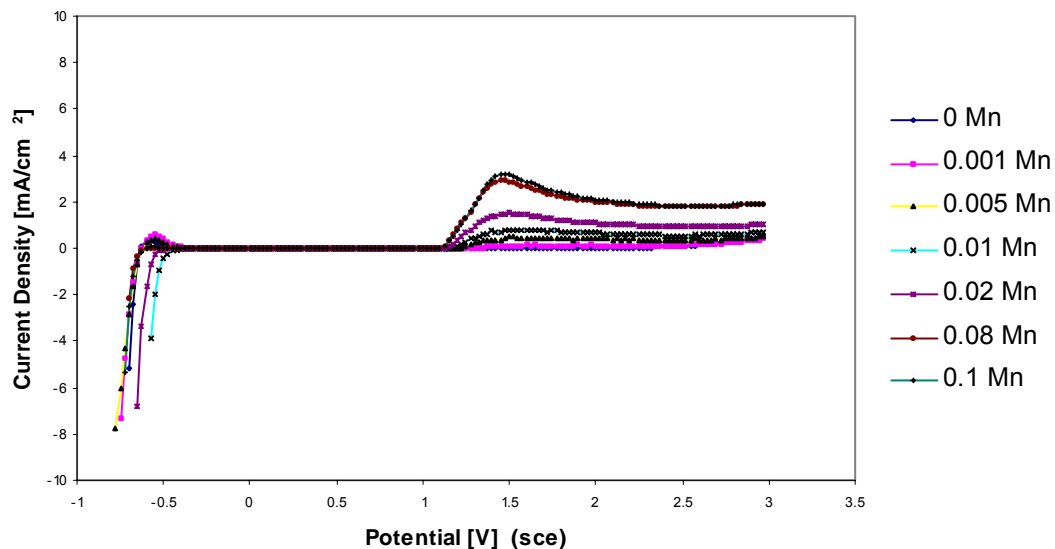


Fig 8. Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 40°C

Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 60°C

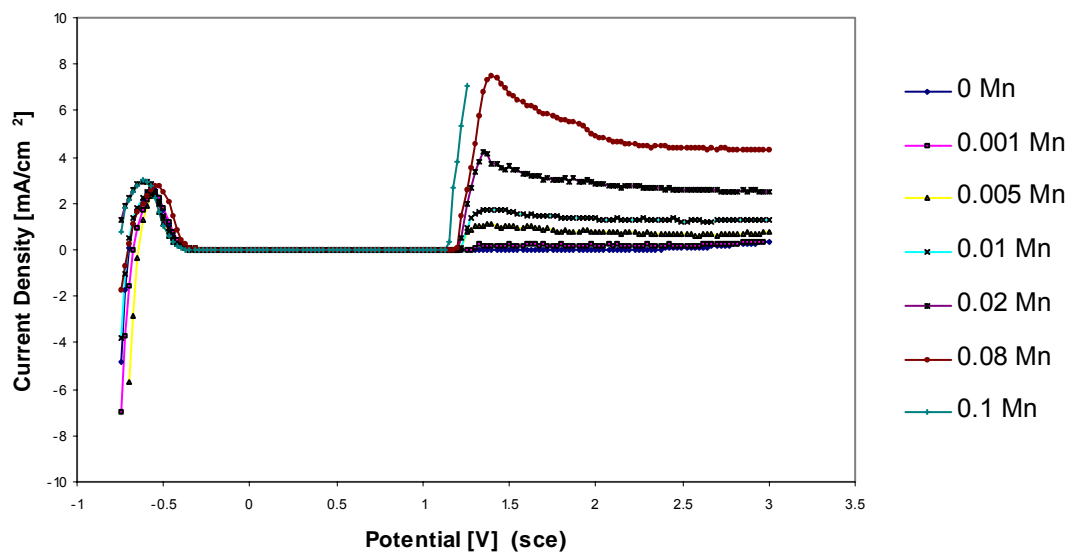


Fig 9. Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 60°C

reduced the corrosion current of titanium at all temperature and acid concentration.

To investigate the effect of Mn(II) ions concentration in the acid, different concentrations of Mn(II) in 1M H₂SO₄ was taken to run identical tests on titanium. Fig 8-11 show voltammogram of titanium in the acid containing different Mn(II) ions concentrations. Corrosion can be seen clearly occurring at

almost all temperatures except at 40°C where the Mn(ii) concentrations were 0.1, 0.08 and 0.02 M. The highest corrosion current at all temperatures was found in the acid containing no Mn(II) ions and it decreased as the Mn(II) ions added to the acid, where the biggest decrease were found at the highest temperature of 98°C. This suggests that the increase in temperature enhances the surface coverage of

Effect of Mn(II) Concentration in 1 M H₂SO₄ at 80°C

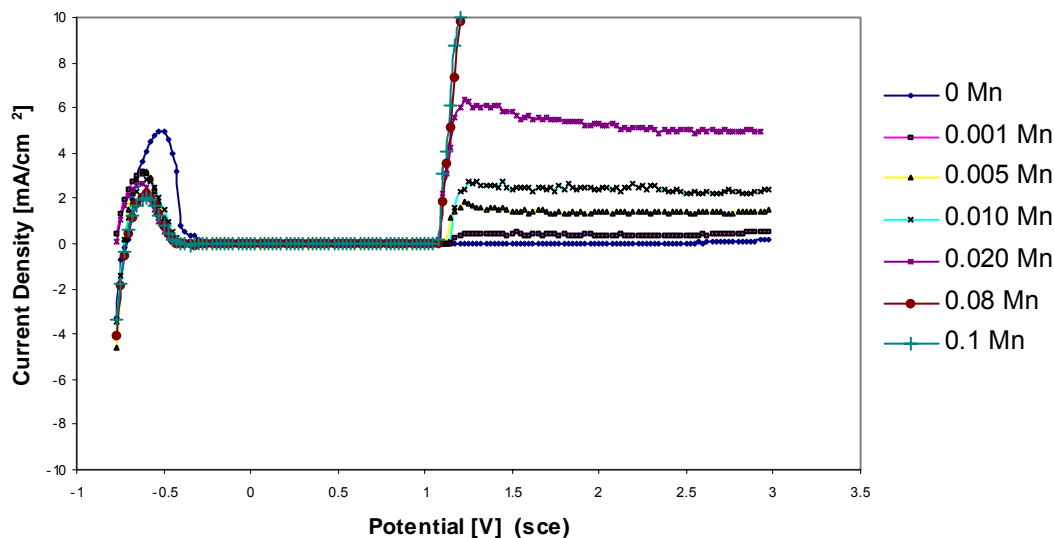


Fig 10. Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 80°C

Effect of Mn(II) Concentrations in 1M H₂SO₄ at 98°C

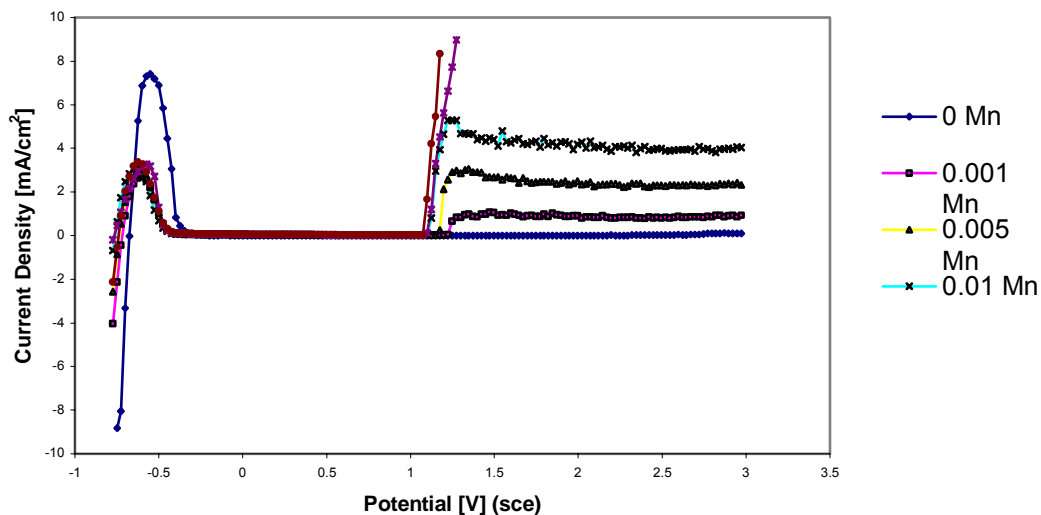


Fig 11. Effect of Mn(II) Concentration in 1M H₂SO₄ at 98°C

Mn(II) adsorption that causes significant decrease in the corrosion current.

Fig 12 summarises the corrosion current density of titanium in 1M H₂SO₄ at different Mn(II) ion concentrations and temperatures. The decrease in corrosion current density continue as the Mn(II) ion concentration was increased up to 0.1M only at 40 and 80°C. At

60 and 98°C the corrosion current density gradually increased after the first decrease on the initial addition of Mn(II) ions in the acid.

The deposition current density increased with Mn(II) concentrations and temperature, as seen in fig 13, indicating that the corrosion of titanium at low anodic potential does not

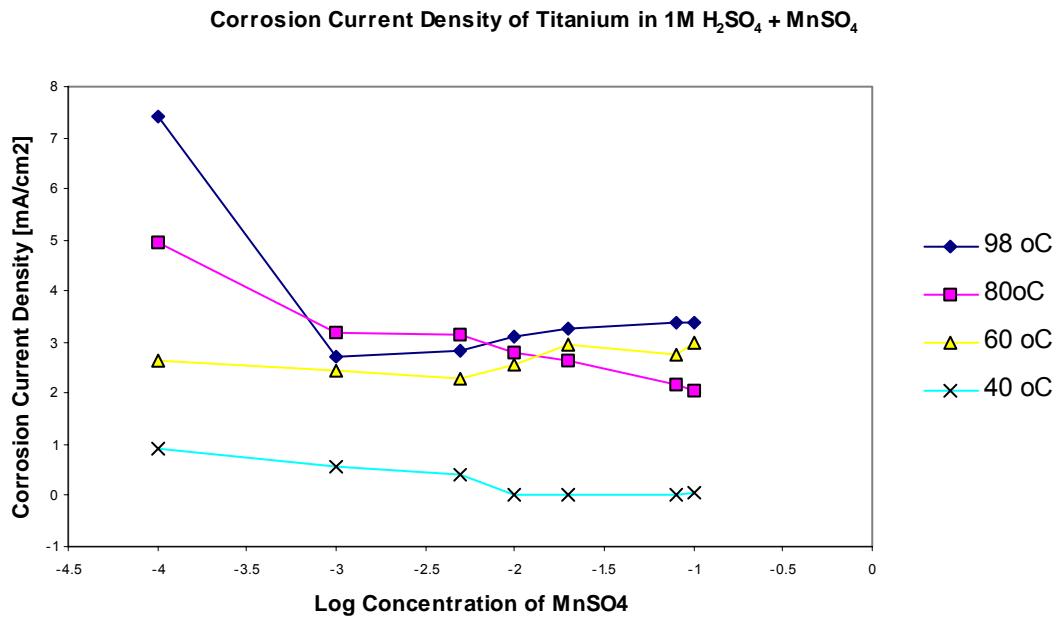


Fig 12. Corrosion Current Density of titanium in 1M H₂SO₄ + Mn(II) [log Mn -4 refers to 0M Mn(II)]

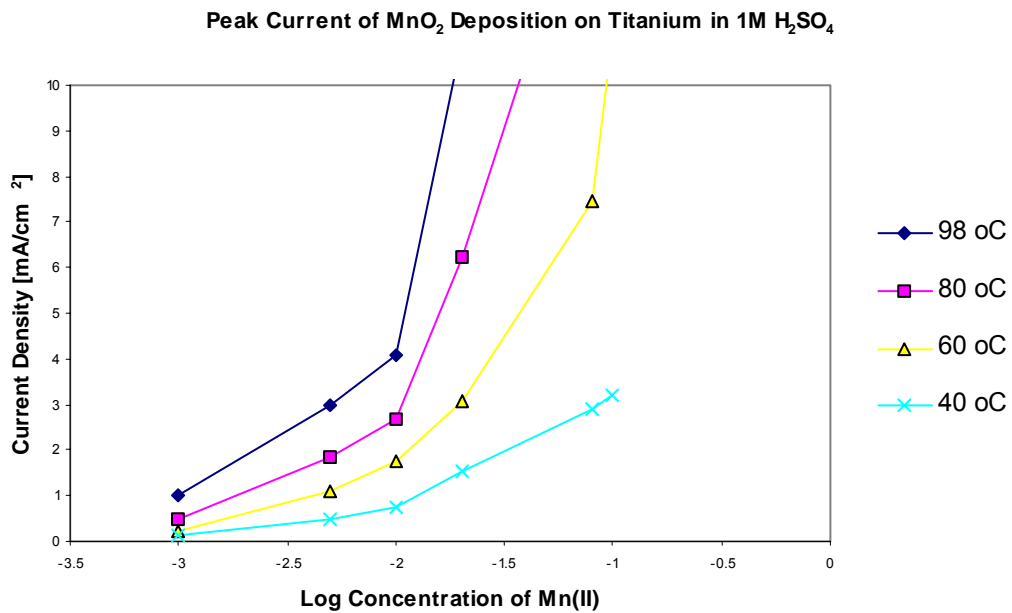


Fig 13. Deposition current density of MnO₂ on titanium in 1M H₂SO₄ + Mn(II)

prevent MnO₂ from depositing onto the surface of titanium.

4. Conclusion

Titanium shows active-passive behaviour in high concentrations of H₂SO₄ containing Mn(II) ions. Corrosion current increases with increasing temperature and acid concentration.

At constant concentration of Mn(II) ions in the acid electrolyte, the increase in H₂SO₄ concentration decreases deposition current of MnO₂. The present of Mn(II) ions in the acid reduces the corrosion of titanium at high temperature and the increase of Mn(II) ions do not reduce MnO₂ deposition on Titanium.

5. Acknowledgement

We wish to thank to Technological and Professional Skill Development Project in The State Polytechnic of Ujungpandang for the support of this research.

6. References

Cartwright et.al., *National Institute for Metallurgy*, Private Bag X3015, Randburg 2125, South Africa.

Caprani, et.al., *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. (1982), 138(1), 155-76.

Fisher, *Battery Material Symposium, Proceedings* (1985), 2nd 315-16.

Hurlent et al, *Electrochimica Acta*, Vol. 31, No.9, pp. 1139-1146, (1986)

Jerkiewicz et al., *Electrochimica Acta.*, 49 (2004) 1451-1459

Kalinovskii, *Zhurnal Prikladnoi Khimii*, Russia (1988), 61(2), 293-8

Mriyaaki, *A study on suppressing passivation of Ti anode for electrolytic production of MnO₂*. Chemical Engineering Department, Fukuoka University, Japan. (1998), 61 159-167.

Pjescic, et.al., *Proceedings of the International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, 5th, Belgrade, Yugoslavia, Sept. 27-29, 2000* (2000), 252-254

Rodrigues et al., *Journal of applied electrochemistry*, 18 (11): 1235-1241, (1988).

Rogulski et al., *Journal of applied electrochemistry*, 543 (2003) 175-185

Tsagareli et al, *Production of the electrolytic manganese dioxide from neutral solutions*, Seriya Khimicheskaya Georgia. (2000), 26(1-2), 176

Microwave Chemistry: Semi-Synthesis Vanillin From Eugenol By Using Microwave Technique

Wahyudi Priyono Suwarso¹⁾, Siti Channah²⁾ and Harry Kurniawan³⁾

¹⁾Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Indonesia
Depok 16424, INDONESIA
e-mail: wps@makara.cso.ui.ac.id

Abstract

It has been performed semi-synthesis of vanillin **3** from eugenol **1a** and/or **1b** as main components of clove oil, by using microwave technique on the household commercial available microwave oven. As first step for this reaction, to the eugenol **1a** and/or **1b** were reacted with KOH-solution 10% and heated in the microwave oven for 1, 2 and 3 minutes, respectively, on heating level I as well as for 1 and 2 minutes respectively, on the heating level II. The yield of isomerized products were following: 22.38% trans-isoegenol **2a** and 2.82% cis-eugenol **2b** (total conversion: 25.20%) on the heating level I for 1 minute; 23.27% trans-eugenol and 2.90% cis-isoegenol (total conversion: 26.17%) on the heating level I for 2 minutes; 29.64% trans-isoegenol and 3.78% cis-eugenol (total conversion: 33.42%) on the heating level I for 3 minutes; 0.19% trans-isoegenol and 90.89% cis-isoegenol (total conversion: 91,08%) on heating level II for 1 minute as well as 0.02% trans-isoegenol and 94.97% cis-isoegenol (total conversion: 94,99%) on the heating level II for 2 minutes. Without any further purification or separation, to the isomerized products were oxidized with 3 mL (0.026 mol) nitrobenzene and heated in the microwave oven on the heating level II for 2 minutes. The yields of vanillin **3** from this oxidation reaction were 6.75% (heating level I for 1 min.); 13.60% (heating level I for 2 mins.); 69.22% (heating level I for 3 mins.); 82.09% (heating level II for 1 min.) as well as 86.10% (heating level II for 2 mins.), respectively. Spectral data of semi-synthesized vanillin as well as its melting point are closing together with related data of natural occurring vanillin.

Key words: Eugenol, isoegenol, , microwave, microwave oven, nitrobenzene, vanillin

1. Introduction

In the electromagnetic spectrum, microwave region is located between infrared radiation, which has shorter wavelengths, and radio frequencies. The wavelength of microwaves ranges from 1.0 cm to 1.0 m, corresponding to the frequencies from 30 GHz to 300 MHz. However, some wavelengths in this region are employed for radar and telecommunication. In order to avoid disruption, only limited wavelengths have been allocated for industrial and domestic microwave ovens intended for heating and drying by international convention. The most commonly used frequency for microwave heating is 2.45 GHz, corresponding to a wavelengths of 12.2 cm (Lew *et al.*, 2002).

There are two mechanisms associated with

microwave heating: dipole rotation and ionic conduction (Kingston, Jassie, 1988). When a molecule is irradiated with microwaves it will attempt to align itself with the electric field by rotation (Lidström *et al.*, 2001). If the frequency of molecular rotation is similar to the frequency of microwave radiation (2.45 GHz), the molecule will continually align and realign itself with the oscillating field, therefore, the electric energy is absorbed by the molecule. It is obvious that compounds with large dielectric constants (e.g. DMSO, DMF) tend to absorb energy readily under microwave irradiation, while less polar substances or compounds with no net dipole moment (e.g. *n*-hexane, dioxane) are microwave inactive.

However, when solvents with comparable

dielectric constants, such as acetone ($\epsilon = 20.6$ D) and ethanol ($\epsilon = 24.6$ D), are heated at the same radiation power and same period of time, the

final temperature will be much higher in ethanol than in acetone (Lidström *et al.*, 2001). In order to compare the abilities of different

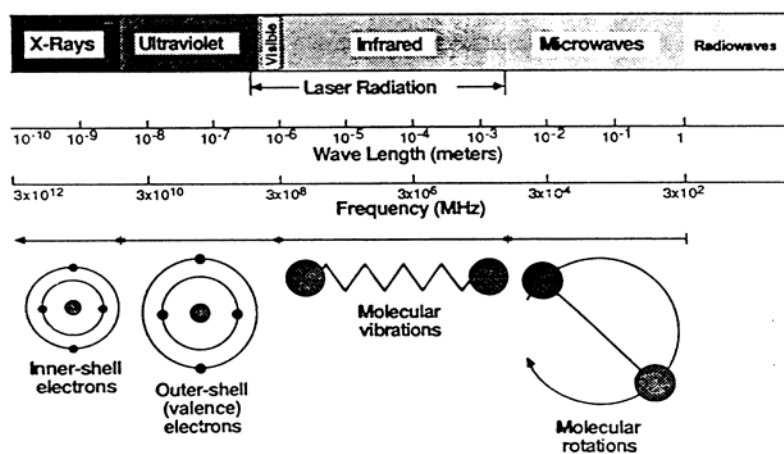


Figure 1. Electromagnetic spectrum



Figure 2. Dipolar molecules which try to align with oscillating electric field

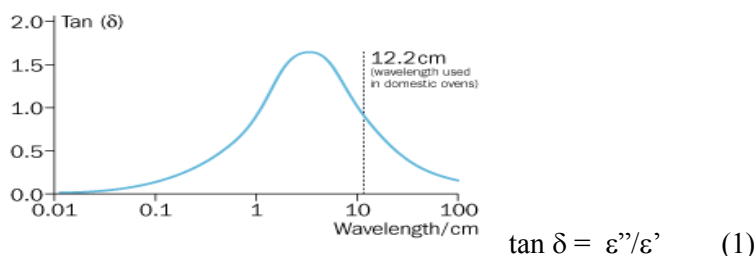


Figure 3. The theoretical background of most commonly used wavelength for microwave heating

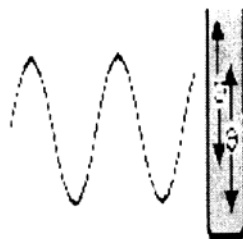


Figure 4. Charge particles in a solution will follow the applied electric field

compounds to generate heat from microwave irradiation, their capabilities to absorb microwave energy and to convert the absorbed energy into heat must be taken into account. The equation (1) is usually used to calculate the ability of compound to convert microwave energy into heat at a given frequency and temperature. Where ϵ'' is the dielectric loss, which measures the efficiency with which the absorbed energy is converted into heat, ϵ' is the dielectric constant, which represents the ability of a dielectric material to be polarized by an electric field. Both ϵ'' and ϵ' are temperature dependent.

The second mechanism, an ionic conduction, also contributes to microwave heating effect, if ions are involved in the sample. When the ionics move through the solution under the applied field, heat is generated by frictional losses, which depend on the size, charge and conductivity of the ions, converting the kinetic energy to the heat (Lidström *et al.*, 2001). Also can be said, that in case of microwaves, the energy transfer does not occur by conduction or convection as in conventional heating, but by dielectric loss. Microwave radiation is converted into heat with high efficiency, so that *superheating* becomes possible at an ambient pressure.

The main advantage of using microwaves in organic synthesis is to dramatically shorten the reaction time. However, since the introduction of microwave assisted organic synthesis (MAOS) in year 1986, there have been debated about what actually alters the rate outcome of the synthesis. It is merely an effect of the thermal heat generated by the microwave or it is a kind of "*specific microwave effect*". Mingos *et al.* (1994) have claimed that the rate acceleration can be contributed to the solvent superheating induced by microwave irradiation. Since ϵ'' and ϵ' are temperature dependent, $\tan \delta$ will increase with temperature. Therefore, the heating rate for these solvents will increase during microwave heating, probably by limiting the formation "*boiling nuclei*". This phenomenon is described as "*superheating*" and may result in the boiling points of solvents being raised up to 26°C above their conventional values. Baghurst *et al.* (1992) also estimated that "*superheating*" can lead to 10-15 fold reductions in reaction times for solution phase microwave assisted organic synthesis

(MAOS) at atmospheric pressure, compared with traditional reflux condition.

In formerly work Soemadhiharga *et al.* (1973) reported the semi-synthesis vanillin **3** from eugenol **1**. In the first step, eugenol should be isomerized by heating at 190°-220°C on strong base, KOH, for 8 hours into isoeugenol **2**. Then in the second step, the isomerization products were oxidized with nitrobenzene at 100°C for 5 hours, but the yield of vanillin **3** was poor, only 3.6% from starting material, eugenol (scheme 1).

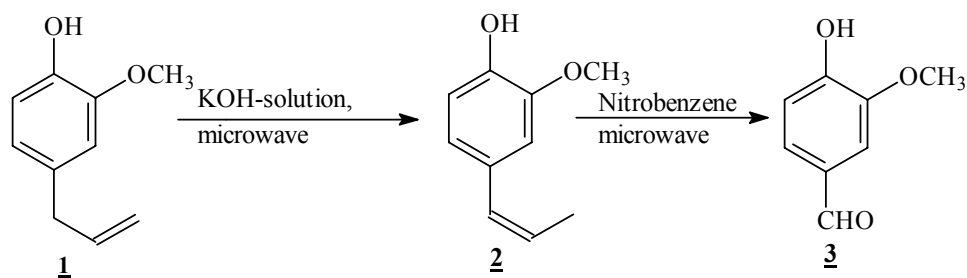
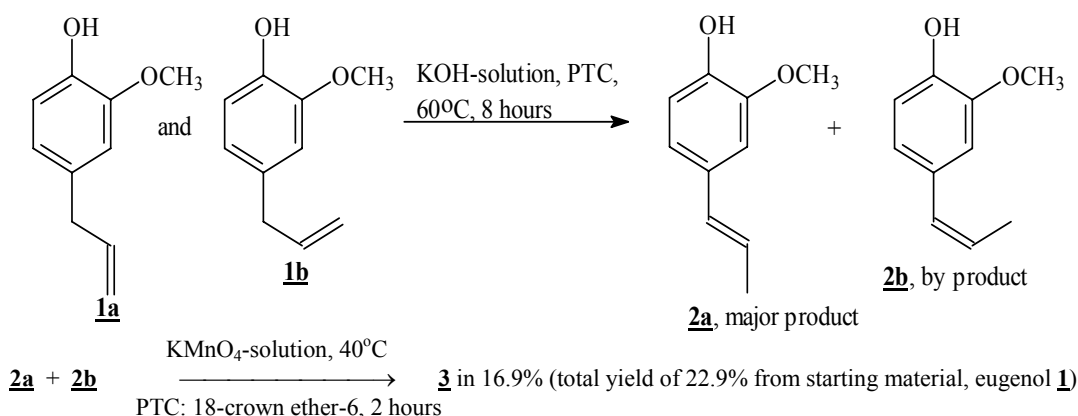
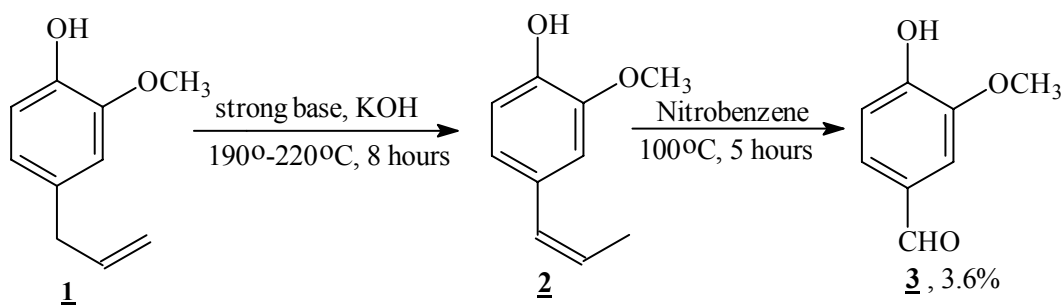
Wijaya (1992) and Priyono Suwarso *et al.* (2002) conducted the semi-synthesis vanillin **3** starting from eugenol **1a** and/or **1b** in two steps. The first step was isomerization of eugenol **1a** and/or **1b** with KOH-solution 10% by heating at 80°C for 8 hours and catalyzed by *Phase Transfer Catalyst* (PTC): 18-crown ether-6 with total conversion of 68.3%, and *trans-isoeugenol* **2a** as major product. The second step, without any purification or separation, the mixture of isomerization products **2a** and **2b** were oxidized with KMnO₄-solution in neutral condition at 40°C, and catalyzed by *Phase Transfer Catalyst*: 18-crown ether-6 for 2 hours with total conversion to vanillin of 16.9%, and the total yield of vanillin **3** was 22.9% from starting material, eugenol (scheme 2).

Now we want to report the semi-synthesis of vanillin **3** from eugenol **1** in two steps by applying of Soemadhiharga's method, but by using microwave technique as heating media. We hope by using microwave assisted organic synthesis (MAOS), the reaction time could be shortened as well as the yield of semi-synthesis vanillin **3** from eugenol **1** could be enhanced (scheme 3).

2 EXPERIMENTAL

a. Isomerization of Eugenol to *trans*- and *cis*-Isoeugenol **2a** and **2b**

2 mL eugenol was mixed with 5.0 mL KOH-solution 10%, then the reaction mixture was stirred and heated in the microwave oven on heating level I for 1, 2 and 3 minutes, respectively, as well as on heating level II for 1 and 2 minutes, respectively. After the certain reaction time reached, the reaction mixture should be cooled down, washed with water, and the water was separated from reaction mixture. The reaction mixture was dried with Na₂SO₄



anhydrous, filtered off, and the isomerization products was ready to be measured on GC to analyze its composition as well as on IR-spectrophotometer.

b. Oxidation of Isomerization Products with Nitrobenzene to Vanillin 3

Without any purification and separation, the isomerization products was mixture with 3.0 mL Nitrobenzene (26.5 mmol), than stirred and the reaction mixture was heated in the microwave oven on heating level II for 2 minutes. After reaction mixture cooled down, than aqueous phase was separated from its organic phase. The aqueous phase was than neutralized with HCl 1.0 M, and the collected

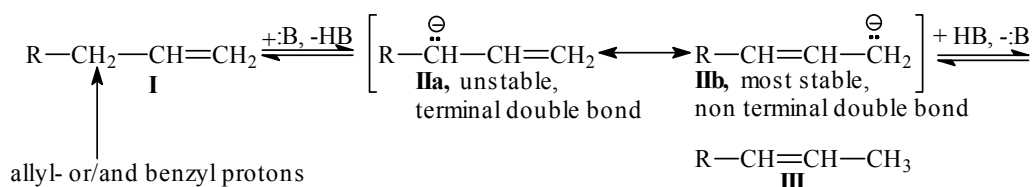
organic phase was evaporized in vacuo. The raw vanillin crystal should be recrystallized in a mixture of warm ethanol-water (2 : 1). The colorless pure vanillin crystal was ready to be determined its yield, melting point as well as its IR-spectrum

3. Results And Discussion

In the first step in this work, it has been tried to determine the temperature in the microwave oven room on heating by heating level I for 1, 2 and 3 minutes, respectively, as well as by heating level II for 1 and 2 minutes. The results of temperature measurement on the inner room of microwave oven are appeared on table 1.

Table 1. The results of temperature measurement on the inner room of microwave oven

Heating time (minute)	Temperature on heating level (°C)	
	I	II
1	57	124
2	83	165
3	105	-



Scheme 4

Table 2. Results on isomerization of eugenol to isoeugenol (counted from peak areas of gas chromatogram)

Heating level	Heating time (minute)	Yield of isomerization products (%)		
		<i>trans</i> -isoeugenol, 2a	<i>cis</i> -isoeugenol, 2b	total
I	1	22.38	2.82	25.20
	2	23.27	2.90	26.17
	3	29.64	3.78	33.42
II	1	0.19	90.89	91.08
	2	0.02	94.97	94.99

Wijaya (1992) and Priyono Suwarso *et al.* (2002) stated, that the reaction mechanism of isomerization of eugenol with strong base **1** to *trans*- and/or *cis*-isoeugenol is [1,3] prototropic rearrangement reaction. Eugenol was considered as allyl- or/and benzyl system, therefore eugenol has H_α-acid or active proton of allyl- or/and benzyl system. If strong base (:B) was added to eugenol, than this active proton (H_α-acid) could be abstracted by strong base to form HB, but in another side, from eugenol **I** could perform unstable carbanion system **IIa** and followed by resonance structure to perform most stable carbanion system **IIb**. There are two reasons, why could be performed most stable carbanion **IIb**. The first explanation is formation *non terminal double bond* **IIb** that stabilized by more hyperconjugations than *terminal double bond* on carbanion system **IIa**. The second explanation is formation of longer conjugation system of double bonds from aromatic system with outer double bond system of side chain, that caused decreasing of the energy content of the hole system (isoeugenol)

compared with energy system of eugenol (scheme4).

The results of heating influence by microwave assisted organic synthesis on isomerization reaction of eugenol **1** to *trans*- and/or *cis*-isoeugenol **2a**, **2b** could be shown in the table 2.

From those results of isomerization products, there are two modes of isomerization product to be attractive discussed, because on heating level I *trans*-isoeugenol **2a** as major product, whereas on heating level II *cis*-isoeugenol **2b** as major product. Eugenol **1** could be viewed has two molecular structures, "*trans*-eugenol" **1a** and "*cis*-eugenol" **1b**. As normal rule in the organic chemistry from viewing of its steric hindrance said, that *trans*-isomer is most thermodynamic stable in low temperature, whereas *cis*-isomer is most thermodynamic stable in high temperature, consequently *trans*-isomer (*trans*-eugenol **1a**) could be transformed into *cis*-isomer (*cis*-eugenol **1b**) by giving of thermal- or photochemical energy. By heating on microwave oven at heating level I

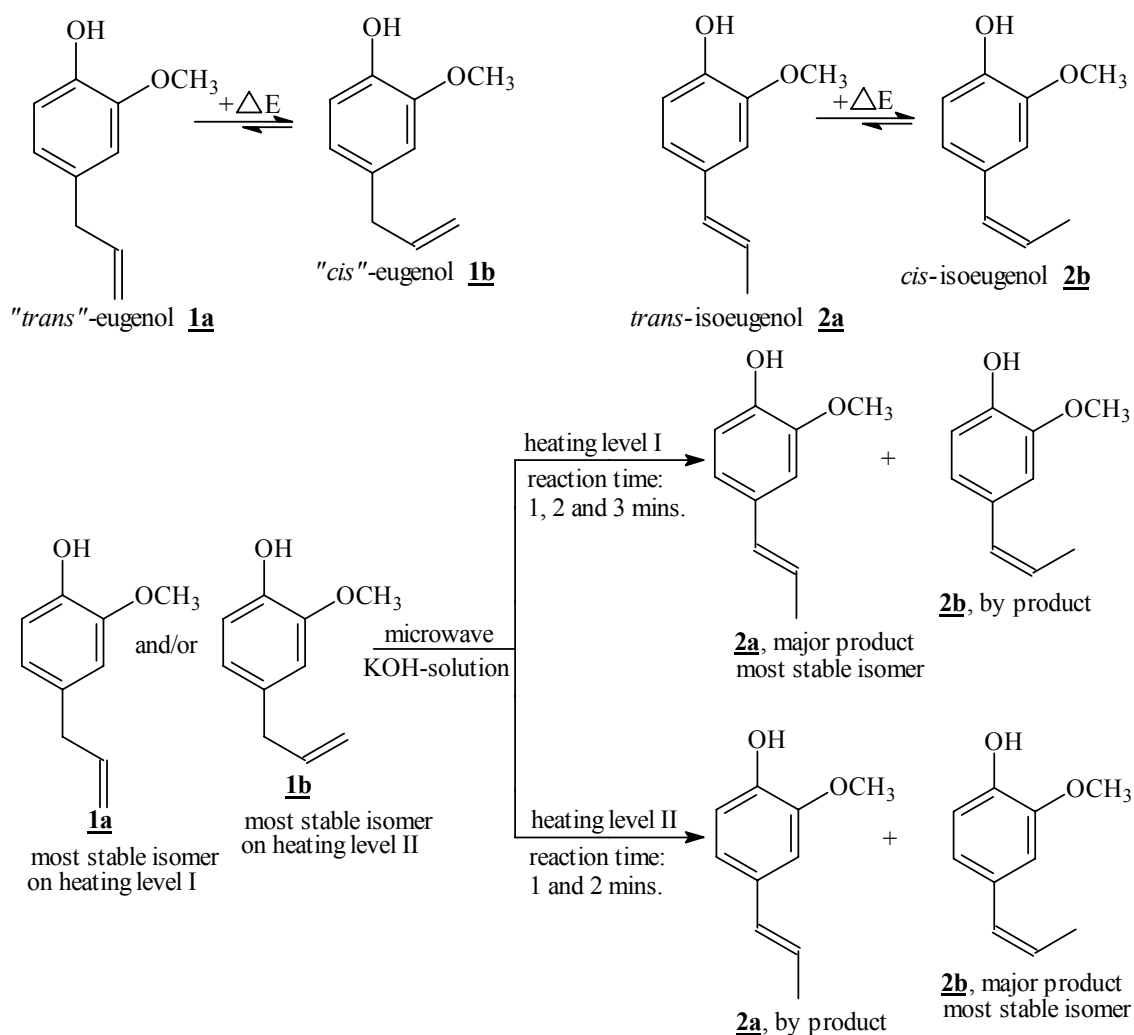
for 1, 2, and 3 minutes (see table 1), it could be considered that the resulted temperature belonged to the "low" criteria, so that the *trans*-isomer (*trans*-eugenol **1a**) could be proposed as most stable structures. Therefore the major product of isomerization reaction was *trans*-isoeugenol **2a** and *cis*-isoeugenol **2b** as minor/by product. In opposite, by heating on microwave oven at heating level II for 1 and 2 minutes (see table 1), it could be considered that the risen temperature belonged to the "high" criteria, so that the *cis*-isomer (*cis*-eugenol **1b**) could be proposed as most stable structure. Also *cis*-isomer (*cis*-isoeugenol **2b**) was major product in this isomerization reaction (scheme 5).

The next reaction was oxidation reaction to oxidize *trans*- and/or *cis*- isoeugenol **2a**, **2b** with nitrobenzene as oxidator on heating at microwave oven into vanillin **3** as main target

for the reaction product in this work. The yield on vanillin could be shown in the Table 3

If the yields of vanillin **3** from this method were compared with the results of formerly work (Soemadhiharga *et al.*, 1973; Wijaya, 1992; Priyono Suwarso *et al.*, 2002), so could be said that by using the microwave assisted organic synthesis (MAOS) method, especially the reaction time could be significantly shortened. From the table 3. could be seen, that on heating level I with heating time 3 minutes as well as on heating level II with heating time 1 and 2 minutes, the percentages of total conversion from eugenol **1** into isoeugenol **2** as well as the yield to the vanillin **3** in the following reaction were very satisfaction.

The mechanism reaction of the oxidation of isoeugenol **2** into vanillin **3** could be described as shown in scheme 6.



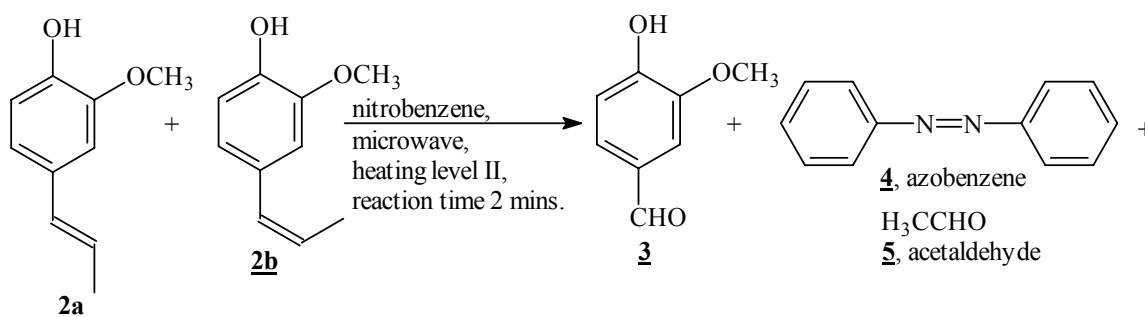
Scheme 5

Table 3. The yield of vanillin **3** from isomerization products **2a**, **2b**

Heating level	Heating time (minute)	Composition of isoeugenol 2 (%)		Yield on vanillin 3	
		<i>trans</i> - 2a	<i>cis</i> - 2b	mmol	%
I	1	22.38	2.82	0.88	6.75
	2	23.27	2.90	1.76	13.60
	3	29.64	3.78	8.99	69.22
II	1	0.19	90.89	10.66	82.09
	2	0.02	94.97	11.19	86.10

Table 4. The comparisons of condition reaction and yield on semi-synthesis of vanillin **3** by using of conventional- and microwave heating

Conventional heating (Soemadhiharga <i>et al.</i> , 1973)		Microwave heating	
Isomerization reaction of eugenol 1 into isoeugenol 2			
a.	Reagent: KOH	a.	Reagent: KOH solution 10%
b.	Heating temperature: 190-220°C	b.	Heating level: - I (57-165°C) - II (124-165°C)
c.	Heating time: 8 hours	c.	Heating time: - 1, 2 & 3 mins. (level I) - 1 & 2 mins. (level II)
d.	Yield: no data	d.	Yield: - 25.20-33.42% (level I) - 91.08-94.99% (level II)
Oxidation of isoeugenol 2 into vanillin 3			
a.	Oxidator: nitrobenzene	a.	Oxidator: nitrobenzene
b.	Heating temperature: 100°C	b.	Heating level: II (165°C)
c.	Heating time: 5 hours		Heating time: 1 & 2 minutes
d.	Yield: 3.6%		Yield: 6.75-86.10%



Scheme 6

4. Conclusion

- Microwave heating is very efficient energy source and could be used to significantly reduce reaction times for semi-synthesis of vanillin from eugenol
- Microwave heating could lead to improve isolated yield of vanillin from eugenol in two steps compared to conventional method in semi-synthesis of vanillin from eugenol

5. References

The physical- and spectroscophical data of semi-synthesized vanillin **3** are closing

together with related data of natural occurring vanillin.

6. References

- Baghurst, D.R.,Mingos, D.M.P., (1999), *J. Chem. Soc. Commun.*, 674
- Kingston, H.M., Jessie, L.B., (1988), Introduction to Microwave Sample Preparation, Theory and Practice, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington D.C.
- Lew, A., Krutzik, P.O., Hart, M.E., Chamberlin, A.R., (2002), *J. Combi. Chem.*, 4, 95

Wahyudi Priyono Suwarso, Siti Channah and Harry Kurniawan

Lidström, P., Tinerney, J., Wathey, B., Westman, J., (2001), *Tetrahedron*, **57**, 9225

Mingos, D.M.P., (1994), *Res. Chem. Intermed.*, **20**, 85

Priyono Suwarso, W., Sukri, T., Wijaja, H., (2002), *Makara Seri Sains*, **6(1)**, 36-44

Soemadhiharga, D., Somaatmadja, D., Ali (1973), Laporan Penelitian: Vanili dari Eugenol Minyak Daun Cengkeh, Balai Penelitian Kimia Bogor, p. 157

Wijaja, H., (1992), Karya Utama Sarjana Kimia, Jurusan Kimia-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Aplikasi Ruang Tutupan Pengekstrakan Mikro Fasa Pepejal Dalam Analisis Kompaun Meruap Pirazin dan Furan Semasa Pemprosesan Gula Kabung (*Arenga pinnata*)

Wan Aida, W.M., Ho, C.W., Maskat, M.Y. & Osman, H.

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains & Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.
03-89293870; Fax: 03-89213232; E-mail: wawm@pktrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Kajian dijalankan untuk menganalisis kompaun pirazin terbentuk semasa pemprosesan gula kabung menggunakan kaedah ruang tutupan pengekstrakan mikro fasa pepejal (RT-PMFP) gas kromatografi spektrometri jisim (GK-SJ). Sampel sebanyak 1 ml diambil setiap setengah jam sepanjang pemasakan air nira selama 4 jam untuk penentuan kompaun pirazin. Kompaun meruap dalam ruang tutupan vial 12 ml diekstrak dengan 2cm fiber divinilbenzene-karboxen-polidimetilsiloxane (DVB-CAR-PDMS) pada suhu pengekstrakan 50oC selama 10 minit. Pembentukan komponen meruap pirazin (nitrogen heterosiklik) mencatat peratusan tertinggi pada masa pemasakan 4 jam bagi kesemua 21 analit pirazin yang dikenalpasti dengan jumlah luas puncak relatif (LPR) merangkumi 87.88% berbanding dengan 7 analit komponen meruap kumpulan oksigen-heterosiklik (9.92% LPR). Hampir separuh daripada LPR komponen meruap gula kabung disumbang oleh dua analit pirazin iaitu 2,5-dimetil pirazin (30.39%) dan 2-etil-5-metil pirazin (19.48%). Antara komponen meruap, 2-etil-3,5-dimetil pirazin, benzeneacetaldehid dan 2-metil butanal dikenalpasti dalam gula kabung pernah dilaporkan sebagai komponen aroma impak dalam pemprosesan makanan terma. Penggunaan kombinasi kaedah RT-PMFP dengan GK-SJ terbukti berjaya mengekstrak kompaun meruap pirazin (kumpulan nitrogen heterosiklik) dan furan (kumpulan oksigen heterosiklik) yakni kompaun meruap yang bertanggungjawab terhadap profil aroma gula kabung secara analitikal semasa pemprosesan gula kabung.

Kata Kunci: Air nira (*Arenga pinnata*), kompaun meruap Maillard, ruang tutupan pengekstrakan mikro fasa pepejal (RT-PMFP), gas kromatografi spektrometri jisim

1. Pengenalan

Gula kabung dihasilkan daripada pemanasan eksudat pokok kabung (*Arenga pinnata*) (Panyakul 2001). Eksudat ini yang dikenali sebagai air nira dimasak secara tradisional di dalam kualiti besar selama beberapa jam merupakan sejenis makanan terproses terma. Aroma yang terhasil dalam kebanyakan makanan terproses terma seperti roti, produk biji-bijirin, kopi panggang dan kacang panggang adalah disebabkan oleh tindak balas Maillard. Menurut Vernin dan Parkanyi (1982), antara kompaun meruap Maillard, N-, O- dan S-heterosiklik kompaun dengan nilai ambang perisa yang rendah merupakan

penyumbang terbesar terhadap profil perisa makanan terproses terma. Sebatian perisa pirazin, pirol, furan, furanone, oksazol, thiazol dan thiophene merupakan antara jenis kompaun meruap yang dikelaskan dalam kumpulan heterosiklik.

Secara amnya, penghasilan perisa merupakan salah satu penyumbang terbesar dalam tindak balas Maillard. Menurut Ames (1990), penghasilan perisa serupa semulajadi melalui tindak balas Maillard dipengaruhi oleh pelbagai faktor iaitu termasuk jenis dan kepekatan reaktan (asid amino dan gula penurunan), kombinasi suhu dan masa pemanasan, nilai pH dan aktiviti air makanan, kehadiran bahan

logam dan oksigen serta agen perencat tindak balas. Dengan itu, kaedah analitikal yang tepat dan efisien dalam penentuan kompaun meruap heterosiklik merupakan salah satu elemen terpenting dalam industri perisa. Memandangkan kebanyakan analit perisa yang dihasilkan oleh tindak balas Maillard adalah meruap dan separa meruap iaitu sangat sensitif terhadap haba, maka, suatu kaedah pengekstrakan yang tidak merosakkan dan berbahaya diperlukan. Persampelan ruang tutupan merupakan salah satu kaedah pilihan yang popular dalam pengasingan perisa kerana kesesuaiannya dalam kajian kompaun meruap yang sangat volatil (Yang & Peppard 1994) dan juga kerana komposisi yang diekstraknya lebih mewakili aroma sebenar seperti yang ditanggap oleh pengguna (Pollien et al. 1997). Pengekstrakan mikro fasa pepejal (PMFP) merupakan suatu kaedah pengekstrakan volatil yang tidak menggunakan pelarut organik dan secara relatifnya menggunakan sedikit hingga tiada pemanasan melalui pendedahan salutan siloxane yang melekat pada plastik fiber, untuk memerangkap kompaun meruap dalam matriks cecair dan udara (Pawliszyn 2000). Kombinasi RT-PMFP merupakan kaedah pilihan dalam analisis aroma yang menawarkan pelbagai manfaat seperti persampelan cepat dengan kos rendah, operasi yang mudah, sensitif, selektif dan sesuai untuk had pengesanan analit yang rendah berbanding kaedah konvensional (Pawliszyn 1997).

Dengan itu, matlamat utama kajian ini adalah untuk menentukan produk-produk Maillard yang terhasil dalam pemprosesan terma air nira (*Arenga pinnata*) semasa pembentukan gula kabung dengan menggunakan kaedah RT-PMFP dan GK-SJ.

2. Bahan dan Kaedah

Bahan Mentah

Cairan manis yang dihasilkan semasa pemasakan air nira (*Arenga pinnata*) dikumpul setiap setengah jam sepanjang proses penghasilan gula kabung (4 jam) daripada pengusaha gula kabung tempatan di Kuala Pilah, Negeri Sembilan, Malaysia. Analisis kompaun meruap pirazin dilakukan pada setiap cairan manis yang dikumpul.

Analisis Ruang-Kepala PMFP

Pemegang PMFP untuk persampelan secara manual dan fiber Stable-Flex

divinilbenzene/carboxen/polidimetilsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm digunakan dalam kajian ini dibeli daripada Supelco (Bellenfonte, PA). Sampel sebanyak 1 ml diletakkan dalam ruang tutupan 12 ml vial dan ditutup ketat dengan penutup menekan dan septum PTFE/silicon. Sampel dalam vial tersebut direndam sedalam 40 mm dalam bekas termostat pada suhu 50°C selama 10 min. Jarum PMFP ditembus melalui septum dan gerakan junaman (plunger) ditekan untuk mendedahkan fiber kepada kawasan ruang tutupan dalam vial 12 ml. Penyahserapan analit secara terma daripada fiber dijalankan dalam kolom penyuntik GK pada suhu 240°C dengan garisan pusat PMFP (0.75 mm i.d., Supelco) dalam keadaan tidak terbahagi (splitless) selama 5 min. Semua analisis dijalankan secara triplikat.

Keadaan analisis gas kromatografi-spektrometri jisim

Semua sampel dianalisis dengan gas kromatografi HP 6890 berpasangan dengan pengesan jisim spektrometri (HP) yang dilengkapi dengan pengawal elektronik tekanan. Pemisahan dijalankan atas kolom kapilari bukan polar HP-5MS (30 m panjang x 0.25 mm i.d) disalut dengan 0.25 μm filem fasa pegun (PDMS, mengandungi 5% fenil) dibeli daripada J & W Scientific, Agilent Technologies. Suhu penyuntik dan pengesan masing-masing adalah 240°C dan 280°C. Gas pembawa helium pada kadar alir 2 ml/min dan pada tekanan konstan 117.5KPa digunakan. Suhu oven diaturcara daripada 50 °C (kekal selama 2 min), kepada 80 °C dan 100 °C pada 20 °C/min (kekal selama seminit) dan kepada 230 °C pada 30 °C/min (kekal selama 2 min). Keadaan parameter GK yang lain adalah seperti berikut: julat penyaringan (m/z) 50-550 a.m.u pada kadar 1.5 scan/c; tenaga pengionan elektron, 70eV.

Identifikasi

Kompaun meruap dikenalpasti dengan menggunakan pangkalan data spektrometri jisim Wiley 275 (Hewlett-Packard Co 1995). Retensi indeks (RI) kompaun meruap dikira dengan merujuk kepada campuran piawai suatu siri n-alkane (C6-C22) yang dianalisis pada keadaan GK-SJ yang sama dengan sampel lain. Integrasi kesemua puncak kromatogram dilakukan berdasarkan pemilihan 3 jisim di kalangan analit untuk setiap kompaun spesifik

yang mempunyai intensiti tertinggi (kebarangkalian > 80%) untuk membezakan kompaun meruap daripada jiran terdekat. Penilaian separa kuantitatif terhadap kepekatan kompaun meruap adalah berdasarkan kepada perbandingan luas puncak kompaun analit kepada luas puncak kompaun piawai dalam, tridecane.

3. Hasil dan Perbincangan Pengenalpastian Kompaun Meruap Maillard

Kromatogram yang diperolehi daripada cairan gula kabung dipanas pada masa yang berlainan (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 dan 240 min) menunjukkan profil yang amat kompleks (Jadual 1). Secara keseluruhan, sebanyak 26 kompaun dikenalpasti pada masa pemasakan ke-210 dan 240 minit bagi setiap cairan gula kabung terproses. Kompaun meruap ini terdiri daripada 2 kelas kumpulan yang utama yakni nitrogen dan oksigen heterosiklik. Kumpulan nitrogen heterosiklik terdiri daripada 19 analit kompaun meruap kelas pirazin manakala oksigen heterosiklik pula terdiri daripada 5 analit kelas furan dan 2 analit kelas furanone. Kehadiran kompaun meruap kumpulan N- dan O-heterosiklik iaitu produk akhir Maillard dalam cairan gula kabung terproses menyokong bukti bahawa tindak balas Maillard sedang berlaku semasa pemprosesan gula kabung.

Jadual 1 menunjukkan kewujudan dan kehilangan beberapa kompaun meruap semasa pemprosesan gula kabung yang mana dijangka mempunyai kaitan dengan proses transformasi dinamik dalam tindak balas Maillard. Memandangkan hanya produk Maillard N- dan O-heterosiklik kompaun yang dikaji dalam eksperimen ini, maka tidak hairanlah sekiranya kesemua 26 analit kompaun meruap meningkat mengikut pertambahan masa pemasakan kecuali analit 5- etil-2,3-dimetil pirazin sahaja mengalami penurunan kepekatan selepas masa pemasakan ke-180 min. Kehilangan kompaun meruap ini kemungkinan disebabkan oleh sifat keisomeran analit ini yang tidak stabil berbanding dengan 2 analit yang lain iaitu 3- etil-2,5-dimetil pirazin dan 2-etil-3,5-dimetil pirazin yang menunjukkan pertambahan kepekatan secara mendadak. Antara kompaun meruap pirazin yang dikenalpasti, hanya 2,5-dimetil pirazin dan 2-etil-5-metil pirazin sahaja yang hadir dalam kesemua lapan siri pemanasan air nira dengan mencatat kandungan

kepekatan yang tertinggi. Bukan setakat begitu sahaja, kedua-dua analit ini juga menunjukkan kesamaan dari segi kedudukan kumpulan metilan iaitu pada kedudukan ke-2 dan ke-5 struktur molekul pirazin. Fenomena ini menyetujui mekanisme yang dicadangkan oleh Chi (1999) yang menyatakan bahawa dalam persekitaran media tanpa gula penurunan, 2,5-dimetil pirazin boleh dihasilkan melalui proses pendekarbonilan diikuti pendehidran asid amino iaitu merupakan jalan tindak balas utama berbanding dengan 2,6-dimetil pirazin yang terhasil melalui proses pendekarbonilan diikuti pendeaminan. Bagi kumpulan O-heterosiklik, kompaun meruap kelas furan kelihatan dominan berbanding dengan kompaun kelas furanone dengan 2-furfural, 2-furan metanol dan 5-metil furfural mencatat kepekatan yang tertinggi (Jadual 1) pada masa pemasakan ke-210 dan 240 minit. Pembentukan kompaun meruap kumpulan O-heterosiklik pada masa ini dijangka mempunyai kaitan dengan persekitaran media tindak balas dalam cairan gula kabung. Menurut Kroh (1994), suhu tinggi berserta nilai pH media yang berasid akan menggalakkan proses pengkaramelan dan akibatnya produk hasil daripada pendegradasian kompaun 2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H) furanone (HMF) akan terbentuk. Pernyataan ini disokong oleh pengenalpastian 2 kompaun hasil degradasi HMF iaitu 2-furfural dan 5-metil furfural dalam kajian ini.

Sungguhpun corak kinetik proses pemanasan air nira menunjukkan variasi yang amat ketara tetapi secara dasarnya 2 kumpulan kompaun meruap dapat dibezakan. Dalam kumpulan pertama, hampir semua kompaun meruap dapat dikenalpasti pada masa pemasakan ke-120 dan mencapai kepekatan maksimum pada masa ke-240 minit iaitu masa akhir pembentukan gula kabung. Kompaun meruap kelas alkil pirazin seperti 2-metil pirazin dan 2,5-dimetil pirazin tergolong dalam kumpulan ini. Manakala, kumpulan kedua pula merangkumi analit seperti 2-furfural, 2-furan metanol dan 5-metil furfural yang mana mula terbentuk pada masa pemasakan ke-210 minit dan mencapai maksimum pada 240 min pemasakan. Memandangkan kedua-dua kumpulan ini menunjukkan keadaan yang hampir optimum pada masa pemasakan ke-240 min, maka 1 kumpulan sampel air nira (B2) yang berlainan

dimasak pada masa ini dikumpul bagi tujuan perbandingan.

Perbandingan Sumbangan Kompaun Meruap Cairan Gula Kabung Terproses

Dalam kajian kompaun meruap sesuatu produk, kedua-dua data kandungan kepekatan (bpb) dan nilai ambang perisa (bpb) amatlah penting untuk tujuan perbandingan kadar sumbangan secara relatif. Bagi memudahkan tafsiran hasil kajian, nilai ambang perisa dalam larutan air bagi kebanyakan kompaun disenaraikan dalam Jadual 1 yang pernah dilaporkan oleh Buttery et al. (1997) digunakan. Nilai ambang perisa (bpb) bagi beberapa kompaun meruap disenaraikan dalam Jadual 2 bersama-sama dengan data kepekatan dan \log_{10} nisbah kepekatan kepada nilai ambang perisa bagi cairan gula kabung terproses.

Berdasarkan kepada Jadual 2, jelas kelihatan terdapat perbezaan yang ketara bagi kepekatan kompaun meruap yang dihasilkan oleh produk cairan gula kabung terproses B1 dan B2. Antara 26 analit kompaun yang dikaji, hanya terdapat 2 analit kompaun meruap yang mana berlaku di atas kepekatan nilai ambang perisa air di dalam kedua-dua cairan gula kabung terproses B1 dan B2. Kompaun yang dimaksudkan ini ialah 2-etil-5-metil pirazin dan 2-etil-3,5-dimetil pirazin masing-masing dengan nilai ambang perisa 100 bpb dan 0.04 bpb pernah dilaporkan sebagai kompaun aroma impak dalam makanan terproses terma dan tergolong dalam kategori alkil pirazin. Secara amnya, kumpulan alkil pirazin ini menyumbang kepada aroma terbakar, kacang hangus dan perisa serupa ubi (Fors, 1983). Namun begitu, nilai ambang perisa bagi kesemua mono dan dimetil pirazin secara relatifnya adalah tinggi (> 1 bpj) dalam kajian ini dan kebarangkalian pirazin jenis ini berperanan dalam penyumbangan aroma makanan terma adalah minor.

Sungguhpun begitu, penggantian satu atau lebih kumpulan metil dengan kumpulan etil pada sisi rantai pirazin boleh menyebabkan penurunan yang ketara terhadap nilai ambang perisa (Guadagni et al. 1972) dan pernah dilaporkan terdapat beberapa analit pirazin gantian rantai sisi dengan kumpulan etil mencatat nilai ambang perisa yang cukup rendah sehingga menjadi kompaun meruap yang penting dalam penyumbangan aroma

terbakar kacang dan makanan terproses terma. Pernyataan tersebut mencapai persamaan dalam kajian ini dengan penemuan nilai ambang perisa kompaun meruap 2-etil-5-metil pirazin dan 2-etil-3,5-dimetil pirazin yang jauh lebih rendah berbanding dengan pirazin yang berantai sisi kumpulan metil (Jadual 2). Selain itu, faktor kedudukan kumpulan metil pada cecincin pirazin juga mempengaruhi nilai ambang perisa kompaun meruap dengan penggantian kumpulan metil pada kedudukan 2,3 mengakibatkan peningkatan nilai ambang perisa berbanding dengan penggantian pada kedudukan 2,5 atau 2,6 (Fors & Olofsson, 1985). Sekali lagi, pernyataan ini jelas terbukti kesahihannya dengan pengenalpastian nilai ambang perisa bagi 2,5-dimetil pirazin (1700 bpb) dan 2,6-dimetil pirazin (1500 bpb) yang lebih rendah berbanding dengan 2,3-dimetil pirazin (2500 bpb) (Jadual 2). Tambahan lagi, peningkatan nombor gantian kumpulan metil atau etil yang bersiri homolog sama pada rantai sisi cecincin pirazin akan mengurangkan nilai ambang perisa alkil pirazin. Maka, tidak hairanlah sekiranya terdapat perbezaan nilai ambang perisa yang ketara antara kompaun induk pirazin (180000 bpb) dengan 2,3-, 2,5- dan 2,6-dimetil pirazin (< 2500 bpb) (Jadual 2).

Bagi kompaun meruap kumpulan O-heterosiklik, tidak kelihatan terdapat perbezaan kandungan kepekatan yang ketara bagi cairan gula kabung terproses B1 dan B2. Berdasarkan kepada Jadual 2, didapati kompaun meruap kelas furan mendominasi aroma dalam kumpulan O-heterosiklik dengan analit 2-furan metanol iaitu produk hasil penurunan 2-furfural mencatat nilai ambang perisa dan kandungan kepekatan yang tertinggi. Sementara itu, kompaun meruap 2-furfural dan 5-metil furfural, produk hasil degradasi HMF dengan nilai ambang perisa (< 1 bpj) mencatat nisbah kepekatan 4:1 pada kedua-dua cairan gula kabung terproses B1 dan B2. Penemuan nilai nisbah kepekatan ini selaras dengan teori Schrodter (1992) yang menyatakan bahawa dalam proses pendegradasian HMF, iaitu produk yang tidak stabil dalam keadaan berasid dan suhu tinggi akan membebaskan 80% produk furfural dan 20% kombinasi produk 5-metil furfural dan 2,5-furandialdehid. Kegagalan penemuan 2,5-furandialdehid dalam kajian ini kemungkinan disebabkan oleh kesediaan kandungan agen penurunan yang

tinggi dalam keadaan persekitaran sampel B1 dan B2 mengakibatkan proses penurunan menjadi dominan dan kecenderungan menghasilkan 5-metil furfural. Pengenalpastian kandungan kepekatan HMF yang rendah (< 7 bpb) pada cairan gula kabung B1 dan B2 dan peningkatan yang mendadak kandungan kepekatan 2-furfural (~200 bpb) dan 5-metil furfural (> 39 bpb) dijangka dapat menjadi penunjuk kepada kualiti perisa produk gula kabung yang terbentuk selain daripada kompaun meruap kumpulan N-heterosiklik.

Dari segi kualitatif, kelas pirazin mencatat kadar sumbangan yang tertinggi secara relatif dengan 90.0% LPR pada B1 dan 70.0% LPR pada B2 diikuti dengan kelas furan deirvatif yang hanya mendapat sekitar 10.0% LPR (B1) dan 30.0% LPR (B2). Perbezaan ini turut disertai dengan bilangan analit yang berlainan pada kedua-dua produk dengan masing-masing mencatat 26 analit (B1) dan 16 analit (B2). Fenomena ini menyokong teori Kroh (1994) yang menyifatkan bahawa penghasilan bahagian relatif sesuatu kompaun meruap dipengaruhi oleh faktor suhu dan keadaan persekitaran samada berasid atau berbes terutama sekali dalam tindak balas Maillard.

Perubahan Profil Kompaun Meruap Maillard Semasa Pemanasan Air Nira

Berdasarkan kepada Jadual 2, didapati terdapat 10 analit kompaun meruap Maillard yang melebihi 1 % LPR pada kedua-dua cairan gula kabung terproses B1 dan B2. Kompaun meruap ini merangkumi 7 kompaun meruap kelas pirazin dan 3 kompaun meruap kelas furan dengan sesetengah kompaun tersebut melebihi kepekatan 1 bpb dan di atas kepekatan nilai ambang perisa air ($\log_{10} K/AP > 0$) akan dianalisis dengan lebih terperinci untuk melihat corak profil penghasilan kompaun semasa pemprosesan gula kabung (240 min). Perubahan profil kompaun meruap kelas pirazin dan furan semasa pemanasan air nira masing-masing ditunjukkan dalam Rajah 1 dan Rajah 2.

Suhu tinggi dan kebesan yang lemah merupakan keadaan pemprosesan yang bersesuaian untuk tindak balas Maillard (Ellis, 1959). Nilai pH yang tinggi dapat mengurangkan kadar pemprotonan atom nitrogen dalam kumpulan amino atau ammonia dan meningkatkan kepekatan kedua-dua

sumber atom nitrogen dalam persekitaran media tindak balas. Peningkatan kepekatan kumpulan amino dan ammonia seterusnya akan memangkinkan proses fragmentasi gula dan menghasilkan banyak fragment kecil yang aktif iaitu sumber dikarbonil untuk terlibat dalam tindak balas seterusnya. Kereaktifan fragmentasi gula dan kesediaan sumber atom nitrogen dalam persekitaran sesuatu media tindak balas amat penting dalam penghasilan kompaun meruap kumpulan N- dan O-heterosiklik terutama melalui tindak balas Maillard. Daripada Rajah 1, didapati corak penghasilan kompaun meruap kelas pirazin adalah hampir sama bagi air nira B1 dan air nira B2 iaitu meningkat dengan pertambahan masa pemanasan. Perbezaan yang ketara bagi kedua-dua sampel air nira semasa pemanasan ialah dari segi kuantiti kompaun meruap pirazin yang terbentuk terutama sekali bagi analit 2,5-dimetil pirazin dan 2-etil-5-metil pirazin. Selain itu, peningkatan mendadak kesemua kompaun meruap kelas pirazin hanya berlaku pada masa ke-150 minit pemanasan jelas menyokong bahawa berlakunya proses pembekalan sumber atom nitrogen daripada kumpulan amino dan ammonia serta sumber dikarbonil akibat fragmentasi gula pada peringkat permulaan masa pemanasan air nira. Dengan itu, dipercayai kekonsistenan nilai pH yang tinggi pada tempoh pemanasan ini (< 150 min) dalam media tindak balas amat penting dalam penentuan kuantiti kompaun meruap Maillard yang terbentuk terutama kelas pirazin.

Rajah 2 menunjukkan corak perubahan profil kompaun meruap kelas furan yang jelas kelihatan berbeza dengan kompaun meruap kelas pirazin. Sungguhpun kompaun meruap kelas furan meningkat mengikut pertambahan masa pemanasan tetapi ia hanya mula berlaku pada minit ke-210. Namun begitu, dari segi kuantiti didapati kandungan kepekatan 2-furfural dan 5-metil furfural bagi kedua-dua cairan gula kabung terproses B1 dan B2 adalah hampir sama kecuali analit 2-furan metanol. Memandangkan 2-furan methanol adalah produk hasil penurunan 2-furfural maka kuantiti kepekatan analit ini yang tinggi pada sampel B1 kemungkinan disebabkan oleh kelebihan sumber gula penurun berbanding dengan B2. Perbezaan sifat kelakuan kedua-dua kelas kompaun meruap ini jelas menunjukkan kekompleksan system yang terlibat dalam

tindak balas Maillard. Menurut Shibamoto dan Bernhard (1976), faktor pemrosesan seperti suhu dan masa tindak balas adalah parameter penting dalam penentuan jenis dan kuantiti produk Maillard yang terbentuk dalam tindak balas Maillard. Memandangkan faktor masa pemanasan ditetapkan dalam kajian corak profil kompaun meruap melalui 8 siri pemanasan, maka dipercayai bahawa perbezaan jenis dan kuantiti kompaun meruap pirazin ini adalah berpunca daripada faktor suhu pemanasan dan ciri-ciri fizik-kimia air nira terutama kandungan dan jenis asid amino dan gula penurun serta nilai pH media.

4. Kesimpulan

Daripada ujikaji yang dijalankan, kompaun meruap 2-etil-5-metil pirazin dan 2-etil-3,5-dimetil pirazin merupakan analit yang dominan dan dijangka bertanggungjawab terhadap aroma gula kabung. Faktor suhu pemrosesan dan sifat semulajadi sumber reaktan dalam air nira yakni kandungan dan jenis asid amino dan gula penurun serta nilai pH media merupakan parameter yang berperanan dalam penentuan kuantiti dan jenis pembentuk kompaun meruap Maillard terutama kumpulan N- dan O-heterosiklik kompaun. Dengan erti kata lain, pemanasan air nira secara tradisional menghasilkan kualiti aroma gula kabung yang tidak konsisten.

5. Penghargaan

Penyelidik ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi atas bantuan kewangan melalui geran IRPA 03-02-02-0071 EA261. Ribuan terima kasih juga ingin disampaikan kepada En. Rahmat, pegawai penyelidik dari Lembaga koko Malaysia atas tunjuk ajar dan bantuan khidmat analisis gas kromatografi spektrometri jisim.

6. Rujukan

Ames, J. M., Guy, R. C. E. & Kipping, G. J. 2001. Effect of pH, temperature and moisture on the formation of volatile compounds in glycine/glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4315-4323.

Buttery, R. G., Ling, L. C. & Stern, D. J. 1997. Studies on popcorn aroma and flavor volatiles. *J. Agric Food Chem.* **45**: 837-843.

Chi, K. S. 1999. Pyrazine formation from serine and threonine. *J. Agric Food Chem.* **47**: 4332-4335.

Ellis, G. P. 1959. The Maillard reaction. In *advances in carbohydrates chemistry*; Wolfrom, M. L., Ed.; Academic Press: New York, pp63-134.

Fors, S. M. 1983. Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds. In *The Maillard reaction in Food and Nutrition*; Waller, G. R. Feather, M. S., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, pp 185-286.

Fors, S. M. & Olofsson, B. K. 1985. Alkyl pyrazines, volatiles formed in the Maillard reaction . I. Determination of odor detection thresholds and odor intensity functions by dynamic olfactometry. *Chemical Senses.* **10**: 287-296.

Guadagni, D. D., Buttery, R. G. & Turnbaugh, J. G. 1972. Odour threshold and similarity ratings of some potato chip components. *J. Sci. Food Agric.* **23**: 1435-1444.

Kroh, L. W. 1994. Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry.* **51**: 37-379.

Panyakul, V. 2001. Palm sugar: the ingenious sweetness. *ILEIA Newsletter.* **13**(2): 19.

Pawliszyn, J. 2000. Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science.* **38**: 270-278.

Pawliszyn, J. 1997. Solid-phase microextraction. *Theory and Practice*; Wiley-VCH Inc.; New York.

Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Munoz-Box, R. & Chaintreau, A. 1997. Hypenated headspace gas chromatography-sniffing technique: Screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2630-2637.

Schrodter, R. 1992. Modelluntersuchungen zur Strukturaufklärung von Modell-melanoidinen mittels Hochfrequenzpyrolyse. Dissertation, Technische Universität Berlin.

Yang, X. P. & Peppard, T. 1994. Solid-phase microextraction for flavour analysis. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 1925-1930.

Shibamoto, T. & Bernhard, R. A. 1977. Investigation of pyrazines formation pathways in sugar-ammonia model systems. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 609-615.

Vernin, G & Parkanyi, C. 1982. Occurrence and formation of heterocyclic compounds. In *The Chemistry of heterocyclic flavouring and aroma compounds*; Vernin, G., Ed.; Ellis Horwood: New York, pp 192-198.

LAMPIRAN

Jadual 1 Kompaun meruap Maillard yang utama dikenalpasti dalam cairan gula kabung (B1) pada 8 masa proses pemanasan yang berlainan^a. (N=3)

N-heterosiklik (Pirazin)		5	90	375	1945	2108	3322	4541	5615
Pirazin	672	0	0	0	0	10	20	35	44
2-metil pirazin	823	0	0	32	77	83	228	437	609
2,5-dimetil pirazin	912	0	66	236	1075	1003	1400	1681	1942
2,3-dimetil pirazin	919	0	0	40	190	192	299	366	417
2,6-dimetil pirazin	936	0	0	0	25	13	26	28	32
2-etil-6-metil pirazin	992	0	0	0	73	47	63	159	317
2-etil-5-metil pirazin	1001	5	24	64	439	578	866	1033	1245
2-ethenil-6-metil pirazin	1016	0	0	0	21	17	19	22	34
3-etil-2,5-dimetil pirazin	1082	0	0	3	16	35	155	352	436
2-etil-3,5-dimetil pirazin	1088	0	0	0	9	21	26	116	157
5-etil-2,3-dimetil pirazin	1089	0	0	0	9	33	45	0	0
2,5-dietil pirazin	1091	0	0	0	11	21	31	33	42
Dimetil-2-vinil pirazin	1098	0	0	0	0	41	97	152	119
5-metil-6,7-dihidro-(5H)-siklopenta pirazin	1147	0	0	0	0	0	0	3	17
3,5-dietil-2-metil pirazin	1162	0	0	0	0	5	23	73	104
2,3-dietil-5-metil pirazin	1171	0	0	0	0	4	6	10	19
2-metil-5-(-1-propenil)- pirazin	1197	0	0	0	0	4	12	15	28
2,5-dimetil-3-cis-propenil pirazin	1233	0	0	0	0	0	3	5	13
2-isopropenil-3,6-dimetil pirazin	1240	0	0	0	0	0	3	7	13
3-furfuril-2,5-dimetil pirazin	1413	0	0	0	0	0	0	7	10
O-heterosiklik (Furan Derivatif)		0	0	0	0	9	23	513	634
2-metil furan	598	0	0	0	0	8.6	20	38	30
2-metil tetrahidro furanone	806	0	0	0	0	0	3	19	27
2-furfural	835	0	0	0	0	0	0	178	193
2-furan metanol	860	0	0	0	0	0	0	221	322
5-metil furfural	964	0	0	0	0	0	0	50	55
2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H)furanone	1060	0	0	0	0	0	0	7	7
3-fenil furan	1224	0	0	0	0	0	0	4	17

^a kepekatan kompaun meruap dinyatakan dalam unit bahagian per billion (bpb).^b Kovat indeks berdasarkan kepada siri alkane (C6-C22)

Jadual 2 Nilai ambang perisa, kepekatan dan luas puncak relatif kompaun meruap Maillard yang dikenalpasti dalam cairan gula kabung B1 dan B2 pada masa pemanasan ke-240 min. (N=3)

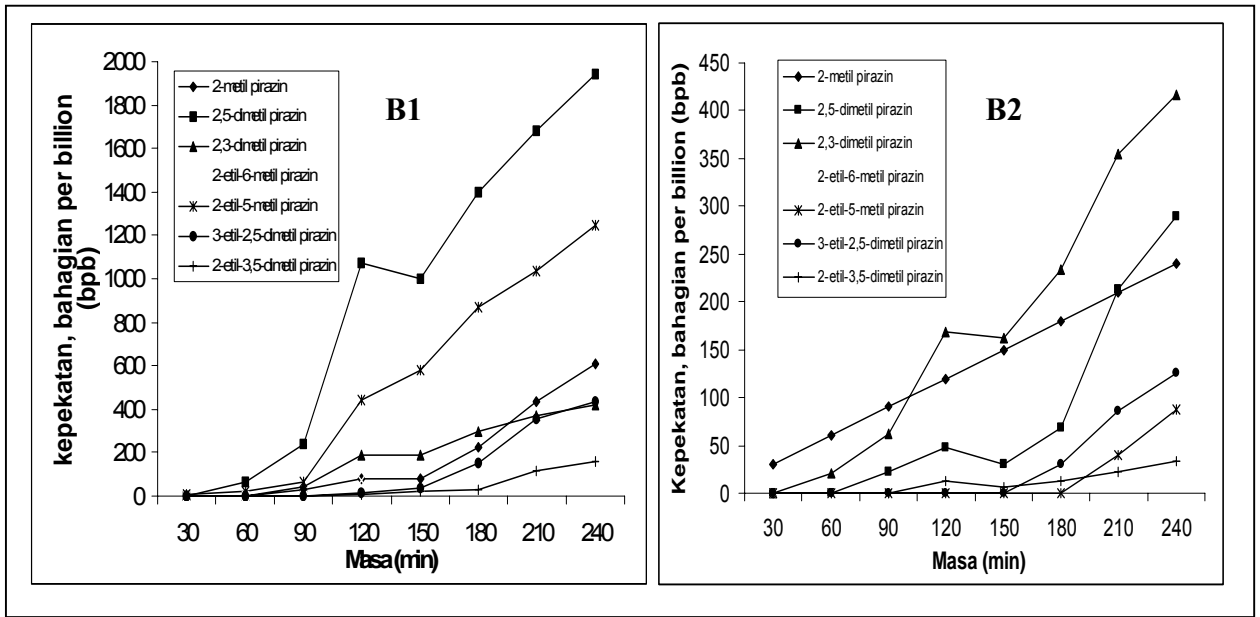
	KI ^b	Ambang Perisa ^b (bpb)	Kepekatan ^b (bpb)		Log ₁₀ k/AP ^c		% LPR ^d	
			B1	B2	B1	B2	B1	B2
N-heterosiklik (Pirazin)			5615	1119			89.8	70.7
Pirazin	672	180000	44	25	-3.6	-3.9	0.7	1.6
2-metil pirazin	823	60000	609	290	-2.0	-2.3	9.8	18.3
2,5-dimetil pirazin	912	1700	1942	417	0.1	-0.6	31.1	26.3
2,3-dimetil pirazin	919	2500	417	91	-0.8	-1.4	6.7	5.8
2,6-dimetil pirazin	936	1500	32	0	-1.7	-	0.5	0
2-etil-6-metil pirazin	992		317	88			5.1	5.6
2-etil-5-metil pirazin	1001	100	1245	126	1.1	0.1	19.9	8.0
2-ethenil-6-metil pirazin	1016		34	16			0.5	1.0
3-etil-2,5-dimetil pirazin	1082		436	33			7.0	2.1
2-etil-3,5-dimetil pirazin	1088	0.04	157	16	3.6	2.6	2.5	1.0
2,5-dietil pirazin	1091		42	0			0.7	0
Dimetil-2-vinil pirazin	1098		119	12			1.9	0.8
5-metil-6,7-dihidro-(5H)-siklopenta pirazin	1147		17	0			0.3	0
3,5-dietil-2-metil pirazin	1162		104	7			1.7	0.4
2,3-dietil-5-metil pirazin	1171		19	0			0.3	0
2-metil-5-(-1-propenil)- pirazin	1197		28	0			0.5	0
2,5-dimetil-3-cis-propenil pirazin	1233		13	0			0.2	0
2-isopropenil-3,6-dimetil pirazin	1240		13	0			0.2	0
3-furfuril-2,5-dimetil pirazin	1413		10	0			0.2	0
O-heterosiklik (Furan Derivatif)			634	464			10.2	29.3
2-metil furan	598		30	0			0.4	0
2-metil tetrahidro furanone	806		27	12			0.4	0.7
2-furfural	835	300	193	201	-0.2	-0.2	3.1	12.7
2-furan metanol	860	1900	322	202	-0.8	-1.0	5.1	12.8
5-metil furfural	964	500	55	39	-1.0	-1.1	0.9	2.5
2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H)furanone	1060	60	7	0	-0.9	-	0.1	0
3-fenil furan	1224		17	10			0.2	0.6

^a Kovat indeks berdasarkan kepada siri alkane (C6-C22)

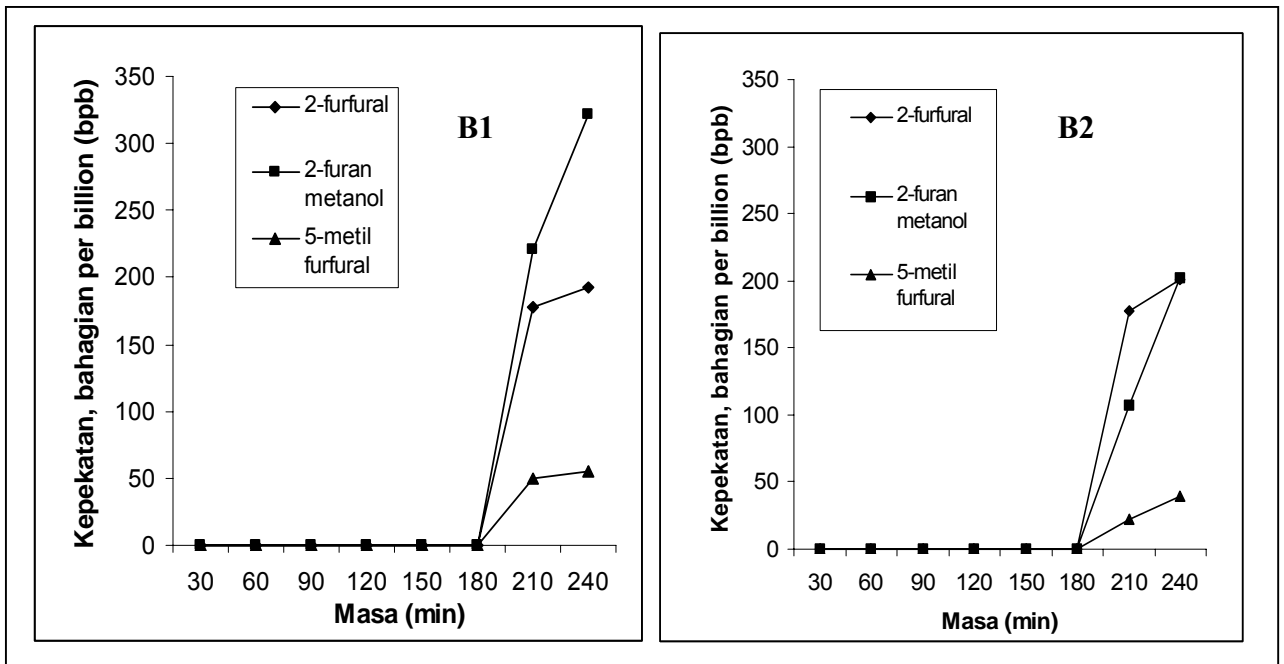
^b kepekatan kompaun meruap dinyatakan dalam unit bahagian per billion (bpb).

^c Nilai ambang perisa kompaun dalam larutan air dinyatakan sebagai bahagian kompaun per billion (10⁹) bahagian air

^d LRP: Luas puncak relatif kompaun meruap



Rajah 1 Perubahan profil beberapa kompaun meruap kelas pirazin (LPR > 1%) yang terhasil semasa pemasakan air nira (*Arenga pinnata*) B1 dan B2 pada selang masa yang berlainan.



Rajah 2 Perubahan profil beberapa kompaun meruap kelas furan (LPR > 1%) yang terhasil semasa pemasakan air nira (*Arenga pinnata*) B1 dan B2 pada selang masa yang berlainan.

Off-line Liquid-Liquid Extraction and Solid Phase Extraction and Online Pre-Concentration Micellar Electrokinetic Chromatography for Analysis of Organophosphorus Pesticides

Wan Aini Wan Ibrahim¹⁾, S. M. Monjurul Alam¹⁾, A. B. Sulaiman¹⁾

1) Chemistry Department, Faculty of Science,
Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Skudai, Johor.
e-mail: wanaini@kimia.fs.utm.my

Abstract

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has grown tremendously in its application since its inception in 1984 by Terabe et al. MEKC with on-column UV detection is the common mode of detection for analytes but this suffer from several drawbacks such as its high limit of detection (LOD) as limited by the optical path length of the column diameter. In an attempt to decrease the LOD, several off-line and on-line methods have been developed for the detection of pesticides. In the current study, solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE) as an off-line extraction method was combined with an on-line micellar electrokinetic chromatography for the separation and detection of three hydrophobic organophosphorus pesticides (OPPs) at the ppb levels. The three OPPs studied viz. quinalphos, diazinon and profenofos are commonly used in the agriculture sector in Malaysia. The LOD of these three OPPs at sub-ppm levels were primarily achieved using sweeping, an online concentration MEKC method obtained from an earlier MEKC separation. LLE with n-hexane offered good reproducible recoveries of the OPPs from spiked lake water with LOD in fractional ppb level while SPE with dichloromethane as eluting solvent also offered LOD at the sub ppb level but with lower recoveries of the three OPPs (38-83%) compared to LLE (71-111%). LLE also gave lower RSD values (8-14%).

Keywords: *Micellar electrokinetic chromatography, sweeping, solid phase extraction, liquid-liquid extraction, organophosphorus pesticides*

1. Introduction

The intensive use of organophosphorus pesticides (OPPs) for boosting the agricultural production in recent years have resulted their residues in various environmental matrices. Powerful separation methods are therefore required to monitor the levels of these hazardous chemicals in drinking waters as well as in other environmental samples. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been considered as an effective tool for the separation of various neutral pesticides [1-7]. The major advantages of MEKC are the higher column efficiency, flexibility in selectivity optimization, small amount of waste generation and easy maintenance. In MEKC, however, minute volume (in nL range) of injected samples and the short path length for the

optical detection cause the poor sensitivity. To overcome this shortcoming, several promising on-line concentrations techniques have already been proposed [8-10]. It has been shown that the phenomenon, termed as "sweeping" can produce a focused sample zone and several orders improvement in detector responses was attained [8]. Through a detailed discussion of theories and relevant models it was suggested that analytes of higher retention factors (k) could be focused by sweeping from a longer injected sample plugs and separation efficiencies were also enhanced [8]. The sweeping phenomenon is defined in a way where analytes are concentrated by the micelles that are present in the running buffer by entering the sample zone that bears no micelles in it [8]. Utility of sweeping in various micellar

systems has been tried and recently reviewed [9]. However, upon application of suitable online concentration procedure in MEKC, the limit of detection (LOD) of the method was still found higher and unsuited for environmental sample analysis [2,5]. Therefore, in most of the pesticides analysis by MEKC, both online and offline sample pre-concentration steps were employed to obtain a required level of LOD [2,5,6].

In an earlier study, we developed a MEKC method for the separation of three neutral hydrophobic OPPs viz. diazinon, quinalphos and profenofos (Figure 1), and appreciably lower LOD were obtained by focusing the sample zones in an application of sweeping technique. In this study, two offline sample pre-concentration method e.g. solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE) were tried using common cartridges and common laboratory organic solvents to achieve further lower LOD for routine use of the method.

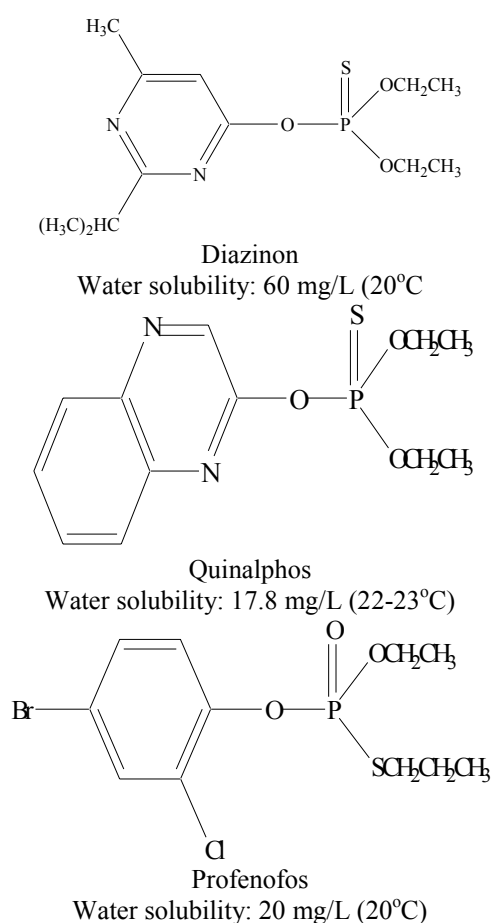


Figure 1. Structure of OPPs used in the study

2. Experimental

2.1 Chemicals

Analytical standards OPPs were purchased from Dr. Ehrenstorfers GmbH (Germany). Acetonitrile and chloroform were purchased from MERCK (Darmstadt, Germany), hydrochloric acid from Sigma (St. Louis, MO, USA), sodium hydroxide pellets from Riedel-de Haen (Seelze, Germany), dichloromethane (DCM) from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), *n*-hexane from Caledon (Georgetown, Ont., Canada) and SPE extraction cartridge, LC 18 from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was purchased from Fisher Scientific (England) and sodium cholate (SC) from Anatrace (USA).

2.2 Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)

MEKC was performed on a CE – L1 instrument (CE Resources, Singapore) with a UV detector (Shimadzu, Japan) and in an uncoated fused-silica capillary (50 μm ID) whose total and effective length was 82 and 42 cm, respectively. The electropherogram were recorded by Chromatography Station software at 202 nm. Uncoated fused-silica capillaries from SGE (Victoria, Australia) of 50 μm inner diameter were used. OPPs standard solutions of about 1 mg mL⁻¹ of each pesticide were prepared in methanol. Dilutions of OPPs in sweeping procedures, corresponding pH and buffer matrices are mentioned in Figure captions. All running buffers were filtered through 0.45 μm nylon filter disc (fit able to the syringe) from Whatman (Clifton, New Jersey, USA). Separation voltage of 25 kV was employed and sample injections were performed electrokinetically (15 kV). Times of injection were mentioned in the Figure captions. All experiments were conducted at an ambient temperature of 25°C. At the beginning of each day, the capillary was rinsed for at least 10 min with 0.1 M NaOH solution followed by DD water for 10 min and conditioned with running buffer for 10 min. In between runs, the capillary was also conditioned by running buffer for 5 min. At the end of the day, the capillary was rinsed with DD water for 30 minutes followed by passing air.

2.3 Solid Phase Extraction (SPE)

Three OPPs with a concentration of 1 ppb each was spiked into 250 mL distilled H₂O and the spiked water was passed through a LC 18

cartridge. Prior to passing the spiked water samples, the cartridge was activated with 2 mL DCM followed by 2 mL distilled water, and immediately spiked water samples were slowly poured (ca. 3 to 5 mL per min) at a suction of <-0.3 bars. After loading the sample, the cartridge was dried by passing air for at least 30 min. The retained OPPs were eluted from the solid phase material with 2×3 mL DCM (at <-0.5 bars). Afterwards, the solvent was evaporated to dryness using a gentle flow of nitrogen and the residue was reconstituted into 0.5 mL buffer matrix (defined in sweeping-MEKC). The concentration of each OPPs became 0.5 ppm. The reconstituted sample for the run in sweeping-MEKC was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter disc to remove the visible particles that supposedly was incorporated from the solid phase material of the cartridges upon the suction condition (<-0.5 bars). This level of suction was found necessary to receive all retained OPPs from the solid phase materials.

2.4 Liquid-Liquid Extraction (LLE)

Two common organic solvents, chloroform and *n*-hexane were used in this LLE procedure. Separation funnels (300 mL) with Teflon stopcocks and stoppers were used. Spiked water sample (250 mL) at 1 ppb of each OPP was poured into the separation funnel and 2 mL of organic solvent (chloroform or *n*-hexane) was added to it. The mixture was shaken vigorously for 15 min and then allowed to stand for 30 min. The funnel was vented to reduce the pressure inside. Following this operation, the organic and aqueous layers were separated. When chloroform was used, the aqueous layer resides over the organic phase, therefore organic portion was easily drained into a glass vial and the second aliquot of chloroform or *n*-hexane (2 mL) was added for the next cycle. However, in the case of *n*-hexane, the organic portion resides over the aqueous phase, therefore the aqueous layer was drained into a cleaned beaker and the organic extract was transferred into a glass vial. After that, water samples were again poured into the separation funnel and 2 mL of another aliquot of chloroform or *n*-hexane was added for second cycle of extraction. In total 5 extractions were done for one batch of 250 mL spiked water (for extraction by both chloroform and *n*-hexane) and the total organic portion ($2 \times$

5 mL) were combined in a glass vial. Organic solvents were evaporated to dryness by a gentle flow of nitrogen and reconstituted into the buffer matrices (1 mL) for the run in sweeping-MEKC.

3. Results and Discussions

Figure 2 shows the electropherogram that was obtained in an earlier study by sweeping-MEKC, where three OPPs were separated by an optimized buffer consisting of 10 mM SDS, 10 mM 1:1 v/v phosphate-borate buffer and 10% v/v methanol-acetonitrile. In this sweeping, the presence of certain amount of organic solvents in sample matrices was found necessary to increase the solubility of hydrophobic OPPs, especially for profenofos. A range of concentration (0.2 to 1.2 ppm) of each OPP in several mixtures was used to prepare a calibration curves for calculating the LOD. The obtained LOD values in sub ppm levels

(Table 1) could be considered as high and unsuitable for determining the maximum permissible limits (ca. in fractional ppb level) of pesticides in water samples even though, the sensitivity enhancement in this sweeping-MEKC over normal MEKC (results not shown here) were about 30 to 50 folds higher (see Table 1). Sensitivity enhancement factors in terms of peak areas (SEF_{area}) or in terms of peak heights ($\text{SEF}_{\text{height}}$) (presented in Table 1) were calculated respectively by the ratio of the peak areas or peak heights obtained from sweeping-MEKC and normal MEKC and corrected by the dilution factors (see the footnote of Table 1).

Other online concentration i.e. stacking [9] did not render better results compared to sweeping-MEKC because these OPPs are non-polar and quite hydrophobic. To further improve the detection sensitivity; it is assumed that application of offline sample pre-concentration technique e.g. SPE and LLE with common solid phase cartridges and common laboratory organic solvents may improve the sensitivity of detection by multiplying the pre-concentration effect of online sweeping-MEKC methods.

3.1 Two step enrichment by SPE and sweeping-MEKC

LC 18 is a common cartridge used in most of the analytical laboratory to extract the nonpolar organic compounds from water, either by

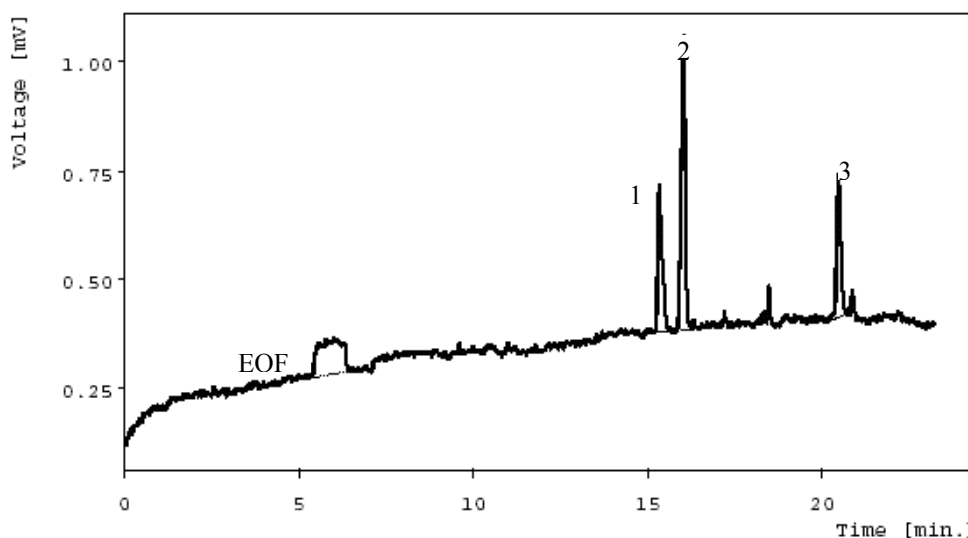


Figure 2 Sweeping-MEKC for the separations of hydrophobic OPPs. Conditions: separation buffer contained 10 mM 1:1 phosphate-borate buffer (pH 9.3), 10 mM SDS and 10 % v/v 1:1 methanol-acetonitrile; sample prepared in 10 mM 1:1 phosphate-borate buffer (pH 9.3) and 10 % v/v 1:1 methanol-acetonitrile; applied potential 25 kV; electrokinetic sample injection for 100 s at 15 kV; total capillary length 82 cm and effective length 42 cm. Peaks: EOF (electroosmotic flow); 1, diazinon (0.8 ppm); 2, quinalphos (0.4 ppm); 3, profenofos (0.4 ppm)

Table 1 LODs and Sensitivity Enhancement Factors (SEF_{area} and SEF_{height}) in sweeping-MEKC over normal MEKC of three hydrophobic OPPs

OPP	LOD by peak area	LOD by peak height	^a SEF_{area}	^b SEF_{height}
Diazinon	0.15 ppm	0.18 ppm	33	47
Quinalphos	0.11 ppm	0.21 ppm	33	42
Profenofos	0.13 ppm	0.21 ppm	27	30

NB. SEF_{area} = (peak area obtained with sweeping-MEKC/peak area obtained with normal NM-MEKC) \times dilution factor

SEF_{height} = (peak height obtained with sweeping-MEKC/peak height obtained with normal NM-MEKC) \times dilution factor

spiking or naturally occurring, into small amount of suitable organic solvents. DCM is one of the organic solvents that has been preferred for extraction of nonpolar compounds with LC 18 cartridges in undergraduate research project in our laboratory. The demonstrated SPE procedure was applied to separate these three OPPs by sweeping-MEKC. Figure 3 shows the electropherogram that was obtained by the two steps enrichment process of SPE and subsequent sweeping-MEKC. The recoveries and the calculated LOD are presented in Table 2. The recoveries were found to be very poor and the reproducibility of recoveries was unsatisfactory as it was enormously high. The LOD, after a 500-fold enrichment from SPE, is still high for quinalphos and profenofos, if it was calculated in terms of peak heights.

The possible sources of unidentified peaks in Figure 3 are the impurities inherited from extracting solvent, or the results of partial decomposition of OPPs on solid surface, or it could be the remnants of solid phase materials that were dislodged by higher suction pressure. However, these impurity peaks did not interfere with the peak of interest. It is assumed that this routine-use of LC 18 cartridge may not be suitable for these OPPs when DCM is used or vice versa, and suitable SPE method could be obtained when other cartridges and different extracting solvents would be optimized in combinational manner, for which substantial time is required to optimize both parameters.

3.2 Two steps enrichment by LLE and sweeping-MEKC

The LLE procedure from the Experimental section was applied to separate these OPPs by

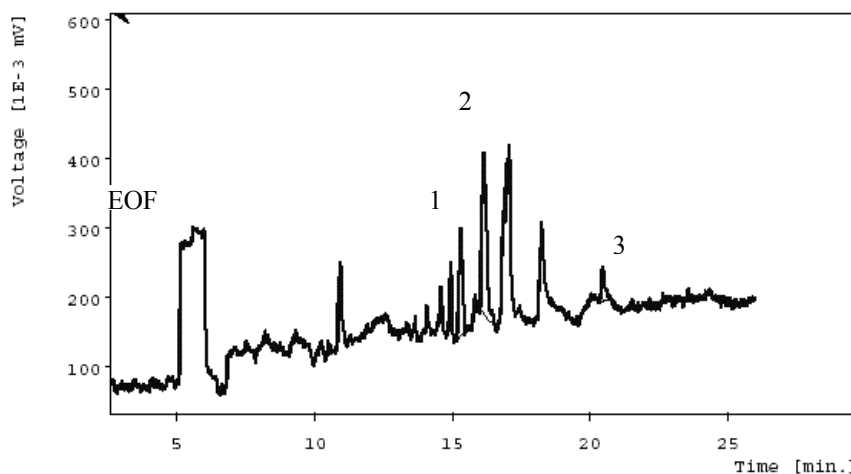


Figure 3 SPE by C18 and DCM in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs. Other conditions, sample preparation and injection are similar to Figure 1. Peaks: EOF, 1 diazinon, 2 quinalphos, 3 profenofos, each 0.5 ppm. Sample enrichment from SPE: 500 fold (250 mL of 1 ppb were finally reconstituted in 0.5 mL buffer matrix)

Table 2 Recoveries and LOD of SPE in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs (n = 3)

OPPs	Recoveries %, peak area basis (RSD)	LOD, by peak area	Recoveries %, peak height basis (RSD)	LOD, by peak height
Diazinon	83 (16)	0.32 ppb	80 (8)	0.45 ppb
Quinalphos	42 (16)	0.48 ppb	30 (18)	1.8 ppb
Profenofos	38 (41)	0.55 ppb	25 (43)	1.1 ppb

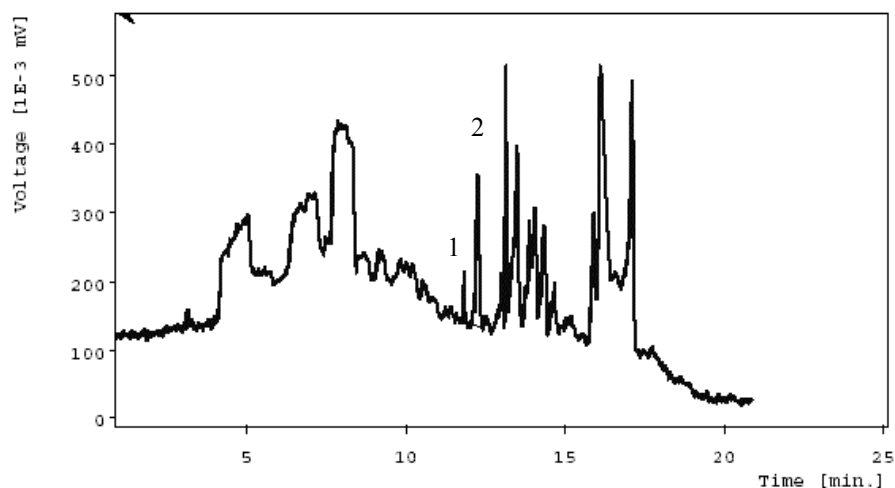


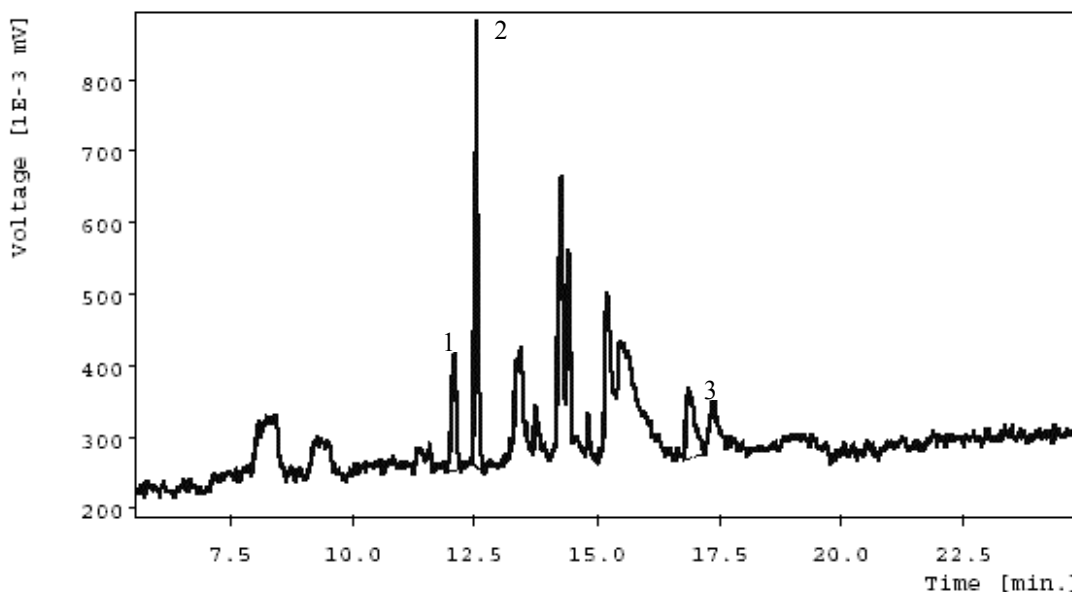
Figure 4 LLE by chloroform in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs. Conditions: separation buffer, sample preparation, sample injection is similar to Figure 2; total capillary length 72 cm and effective length 37 cm. Peaks: 1 diazinon, 2 quinalphos, 3 profenofos, each 0.25 ppm. Sample enrichment from LLE: 250 fold (250 mL of 1 ppb were finally reconstituted in 1.0 mL buffer matrix)

sweeping-MEKC. Figure 4 shows the electropherogram that was obtained by the two steps enrichment process of LLE with chloroform and subsequent sweeping-MEKC separation. The recoveries and the calculated LOD are presented in Table 3.

LLE with chloroform has offered comparatively better results than SPE in terms of reproducibility of recoveries (RSD is about 10 to 20), but still the recoveries were very poor. And in this case, some strong unidentified peaks shaded the profenofos peak. Possibly those unwanted peaks were responsible for

Table 3 Recoveries and LOD of LLE by chloroform in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs (n = 3)

OPPs	Recoveries %, peak area basis (RSD)	LOD, by peak area	Recoveries %, peak height basis (RSD)	LOD, by peak height
Diazinon	55 (18)	0.60 ppb	77 (8)	0.90 ppb
Quinalphos	48 (23)	0.70 ppb	56 (19)	2.0 ppb
Profenofos	----	----	----	----

**Figure 5** LLE by *n*-hexane in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs. Conditions: separation buffer, sample preparation, sample injection is similar to Figure 4. Peaks: 1 diazinon, 2 quinalphos, 3 profenofos, each 0.25 ppm. Sample enrichment from LLE: 250 fold (250 mL of 1 ppb were finally reconstituted in 1.0 mL buffer matrix)**Table 4** Recoveries and reproducibility of LLE (by *n*-hexane) in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs (n = 3)

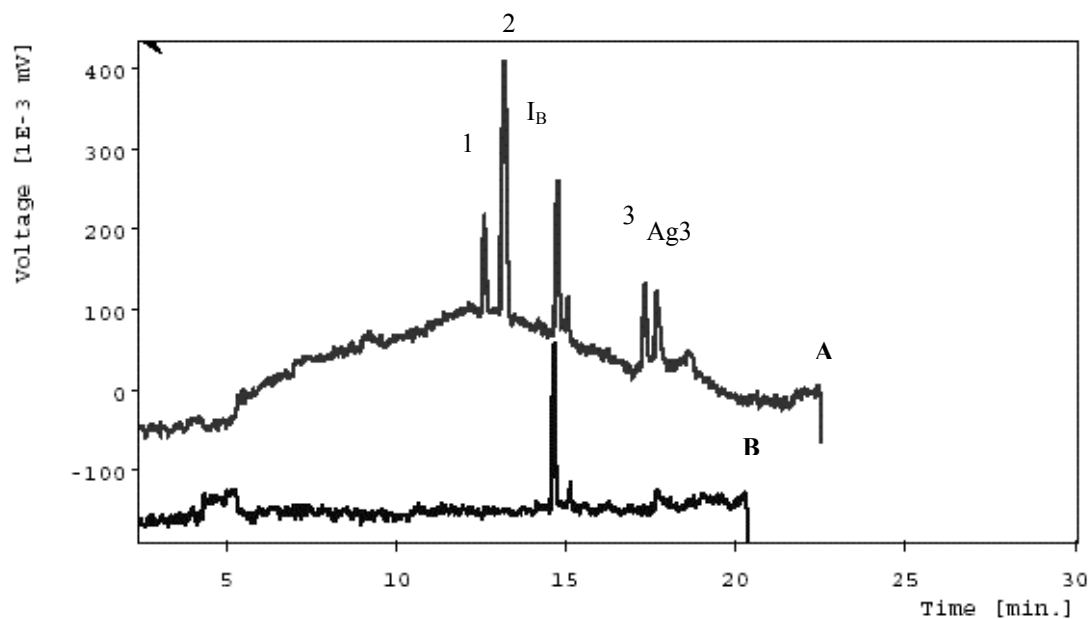
OPPs	Recoveries %, peak area basis (RSD)	LODs, by peak area	Recoveries %, peak height basis (RSD)	LODs, by peak height
Diazinon	106 (11)	0.45 ppb	112 (8)	0.62 ppb
Quinalphos	83 (10)	0.52 ppb	111 (13)	0.79 ppb
Profenofos	93 (2)	0.56 ppb	71 (14)	1.01 ppb

impurities of the extracting solvents as in total 10 mL organic solvents were used for five cycle extraction and were evaporated thereafter. A few broad hump-like peaks with shorter migration (between 5 to 10 min) are probably due to the dissolved trace materials in water that were concentrated by the extracting solvents. The LOD on the basis of peak height, including 250-fold enrichment is still high for quinalphos

Figure 5 shows the electropherogram of LLE with *n*-hexane and sweeping-MEKC separation. The recoveries and the calculated LOD are presented in Table 4. LLE with *n*-hexane has offered better reproducible recoveries compared to the other two counterparts. The lowest recoveries was 71% profenofos on the basis of peak height but it was 92% on peak area basis, that implied its poor peak efficiency compared to direct run of

Table 4 Recoveries and reproducibility of LLE (by *n*-hexane) in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs (n = 3)

OPP	Recoveries %, peak area basis (RSD)	LODs, by peak area	Recoveries %, peak height basis (RSD)	LODs, by peak height
Diazinon	106 (11)	0.45 ppb	112 (8)	0.62 ppb
Quinalphos	83 (10)	0.52 ppb	111 (13)	0.79 ppb
Profenofos	93 (2)	0.56 ppb	71 (14)	1.01 ppb

**Figure 6** Blank and aged standard runs in sweeping-MEKC for the separation of hydrophobic OPPs. A, run of three aged OPPs; B, sample matrices run without OPPs; Conditions: separation buffer, sample preparation, sample injection is similar to Figure 2. Peaks: 1 diazinon, 2 quinalphos, 3 profenofos each 0.25 ppm, I_B Impurities associated with buffer, Ag₃ peak is from aged profenofos (ca. 3 months)

standard. The LOD obtained was in fractional ppb level. However, most of the unidentified peaks were found attributable to the impurities inherited in extracting solvent, therefore, the purity of extracting solvent are crucial. Similar to chloroform but to a lesser extent, *n*-hexane also has concentrated some hydrophilic impurities with shorter migration times. However in LLE, the system was shaken arbitrarily for 15 min considering that equilibrium has been achieved and sometimes emulsions was formed; therefore it was stand for a longer time.

At the end, sweeping-MEKC of OPPs standards and blank water samples without spiking any OPPs were also made (Figure 6). The single peak in blank sample is either impurity from water or from acetonitrile, as the other components were same as before (Figure

2). The same deionized water source was used but was collected in different time period. And similarly, acetonitrile used in Figure 5 was from a different batch but the brand was same. Secondly, because of aging of stock standards, profenofos gave a pair of peak (Figure 6, Figure 2), where the first one is considered to be the equivalent to the peak of profenofos in Figure 1. The comparatively faster migration of each OPP in Figure 6 is due to the shorter capillary length used in this study (Figure 4 – 6).

4. Conclusions

In conclusion, LLE with common laboratory organic solvent *n*-hexane was found to be the quicker way to improve the detection sensitivity but in this regard solvent of highest purity level should be used, therefore the chance of concentrating the impurities in

certain zones would be minimized. The LOD attainable with offline SPE (using DCM) and offline LLE (using *n*-hexane) was in the range of 0.45 – 1.0 ppb and 0.62 – 1.01 ppb respectively with recoveries ranging from 38 – 83% and 71 – 112% respectively.

5. Acknowledgment

The authors gratefully acknowledged the financial support provided by Ministry of Science, Technology & Innovation (MOSTI), Malaysia through IRPA grant (project no: 08-02-06-0060).

6. References

- [1] Susse, H. and Muller, H. (1995). Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the analysis of pesticides. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, 470-473.
- [2] Susse, H. and Muller, H. (1996). Pesticide analysis by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 730, 337-343.
- [3] Farran, A., Ruiz, S., Serra, C. and Aguilar, M. (1996). Comparative study of high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography applied to the analysis of different mixtures of pesticides. *J. Chromatogr. A.*, 737, 109-116.
- [4] He, Y. and Lee, H. K. (1998). Orthogonal array design experiments for optimizing the separation of various pesticides by cyclodextrin-modified micellar

electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 793, 331-340.

[5] Quirino, J. P., Inoue, N. and Terabe, S. (2000). Reversed migration micellar electrokinetic chromatography with off-line and on-line concentration analysis of phenylurea herbicides. *J. Chromatogr. A.*, 892, 187-194.

[6] Farran, A. and Ruiz, S. (2004). Application of solid-phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography to the study of hydrolytic and photolytic degradation of phenoxy acid and phenylurea herbicides. *J. Chromatogr. A.*, 1024, 267-274.

[7] W. Ibrahim, W. Aini., Alam, S. M. M. and Sulaiman, A. 2003. Separation of organophosphorus pesticides using micellar electrokinetic chromatography. *Jurnal Teknologi*, 38 (C) Jun., 51-60.

[8] Quirino, J. P. and Terabe, S. (1999). Sweeping of analyte zones in electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.*, 71, 1638-1644.

[9] Quirino, J. P., Kim, J. B. and Terabe, S. (2002). Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitive analysis in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 965, 357-373.

[10] Kim, J. B. and Terabe, S. (2003). On-line sample preconcentration in micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1625-1643

Alluvial Monazite from Tin Mining Areas of Peninsular Malaysia

Wan Fuad Wan Hassan

Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43650 Bangi MALAYSIA
wafutu@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Monazite (La,Ce,Nd)PO₄ is an ubiquitous mineral in any heavy mineral assemblage found in almost all heavy mineral samples from placer mining through-out Peninsular Malaysia. In the Peninsular, two monazite varieties, yellow and green, are found. The yellow variety is common, observed as fine brownish-yellow rolled, elongated grains, found all over the country, while the green variety, observed as flattened grains, is rare and observed only in significant amount in samples from Semiling in Kedah. Monazite grains from this and other localities were studied under the microscope and microanalysed using a Phillips XL30 Scanning Electron Microscope equipped with an X-ray element analyser. Analytical results show that in most samples, Ce is the dominant REE and that they are monazite-Ce. Of the yellow and green monazite, the brownish yellow monazite has higher La (0.00 – 20.13 %) and Ce (28.07%-38.13%) contents, while the green variety contains lower La (max. value 13.32%), lower Ce (max. 29.24%), and higher number of accessory elements. Of the accessory elements, Ca and U is present in the green monazite but is not found in the yellow monazite and the green colour of some monazite may probably be caused by the presence of these elements. Geologically, the common yellow monazite is associated with hydrothermal, lower temperature-pressure tin-bearing formational environment whereas the green monazite is found in significant amount only in Semiling where it is associated with a higher temperature-pressure pegmatitic Sn-Nb-Ta environment.

Key words: *alluvial monazite, colour difference, grains shapes, Peninsular Malaysia, SEM microanalysis,*

1. Introduction

Monazite is a monoclinic REE bearing phosphate mineral. Depending on the major REE present, it could be a Ce, La or a Nd monazite but by far the commonest is the Ce monazite, (Ce, La, Nd, Th,Y)PO₄. Because of its REE content, it is the ore mineral for several rare earth metals, notably thorium, cerium and lanthanum. These metals have their own specific industrial uses. Thorium itself is radioactive and could be used as a replacement for uranium in nuclear power generation.

Monazite usually occurs as an accessory mineral in granite, syenite and some gneiss. Coarse grained variety is found in pegmatite. In Peninsular Malaysia, monazite is a common

mineral by-product of placer tin mining. It is one of the heavy minerals found in the alluvial tin ore where cassiterite, the main tin mineral, is found together with monazite, xenotime, ilmenite, zircon and other minerals. Monazite is particularly plentiful in alluvial concentrates overlying granitic terrains and become scarce in samples taken over limestone or sedimentary bedrocks.

Malaysian monazite is predominantly brownish yellow in colour and has resinous lustre. In Semiling at the southern foothill of Gunung Jerai and Bakri in Johor and occasionally in Kampung Gajah in southern Kinta Valley, green monazite is also observed. The green variety is quite common in Semiling, found

together with cassiterite, columbite-tantalite, gahnite and a host of other minerals. In Bakri heavy mineral sample, green monazite is less common, seen together with cassiterite and columbite-tantalite. Monazite shows two dominant shapes; flattened form parallel to (100) and elongated rolled grains. The latter form is more common while the green monazite usually appears as flattened grains. Other workers (e.g. webmineral) indicate that the form and shape of monazite crystal is dependent on its metallic element component. Monazite-(La), the La dominant member, has a flattened shape, and monazite-(Nd), the Nd dominant member has a more stubby shape while monazite-(Ce), the dominant variety has a shape somewhere in between .

In this work, monazite samples were studied in terms of its grain morphology and chemical composition. The study hoped to see if there is any relationship between the monazite chemical composition and its crystal shapes. The chemical composition may also reveal the reason for the colour difference between the yellow and green monazite.

2. Samples

Monazite samples for the present work were obtained from the present writer's collection of heavy mineral samples collected in the 1970s when tin-mining operations were still active. Heavy mineral samples containing monazites were collected from the western tin belt covering Semiling, Bakri, Kinta Valley as well as the eastern tin belt, mainly from Sungai Satak and Gambang in Pahang and Air Putih in Trengganu. They were mainly washed heavy mineral concentrates from tin mines and some were panned from streams. Monazite from Semiling in Gunung Jerai, Kedah and Bakri in Johor comes from a higher pressure-temperature pegmatitic environment where it is found together with cassiterite, columbite-tantalite, gahnite and other minerals (Wan Fuad Wan Hassan 1989), whereas monazite from other areas are from lower pressure-temperature hydrothermal environment where it is associated with usual heavy minerals. Monazite in primary environment is not known to have been described from Malaysia.

3. Analytical Method

Alluvial monazite grains were hand-picked under a binocular microscope and separated for grain morphological observations and for

microanalyses. Grains from different areas were observed for their morphological characteristics and comparisons were made. From the samples, representative grains of yellow and green monazite were hand-picked and mounted on a sample holder for microanalysis using a Phillips XL30 Scanning Electron Microscope fitted with a an X-ray elemental analyser. Microanalysis involves point analysis on a selected surface of the mineral grain. SEM photomicrographs of representative grains were also made.

4. Result and Discussion

a) Description of the monazite grains.

Alluvial monazite observed are usually fine grained, measuring about 1 mm or less in maximum direction. The grains are present in two dominant forms; elongated prismatic rolled grains which is the predominant form, and the flattened form parallel to (100) (Figure 1). In between the two are a host of other intermediate forms. The prismatic elongated shape is rather peculiar as it is the most common form whereas literatures do not describe it as such (Ford 1951, Berry *et al.* 1995). Usually the grains show much rounding along the edges due to abrasion during transportation but the few well-preserved ones show beautiful (100) face. Predominant colour is translucent brownish-yellow. Green variety is rarely present and is observed in significant amount only in the Semiling sample, and occasionally observed in Bakri sample but rare from other areas. The yellow monazite commonly appears as elongated prismatic rolled grains and less common as flattened grains but the green monazite is more common in the flattened form. Occasionally transparent yellow or green grains are found showing vitreous lustre.

From observations made, form and shape of the grains vary from the dominant elongated rolled grains to the flattened shape. Chemical compositions below indicate that all the monazite samples analysed are of Ce variety irregardless of its crystal shapes whether as elongated rolled or flattened grains. Thus, the chemical composition seems to have no strong bearing on crystal shape.

b) Chemical composition of Monazite

Result of microanalyses of yellow and green monazite grains are given in Tables 1 and 2. Compositional spectrograms for representative

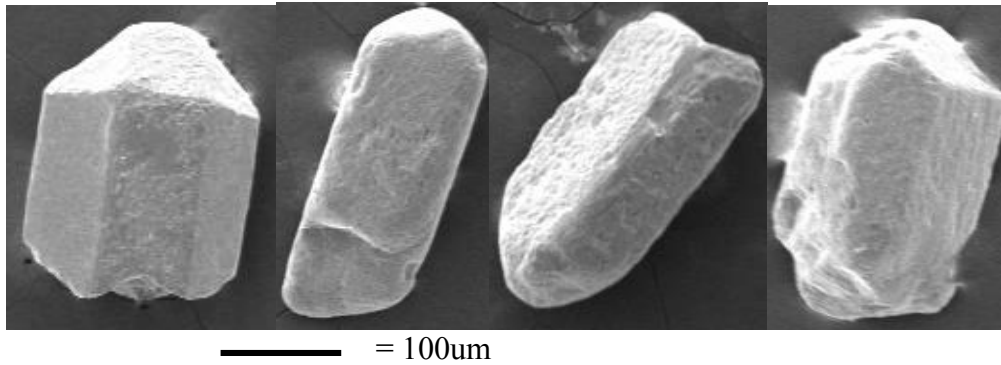


Figure 1.a

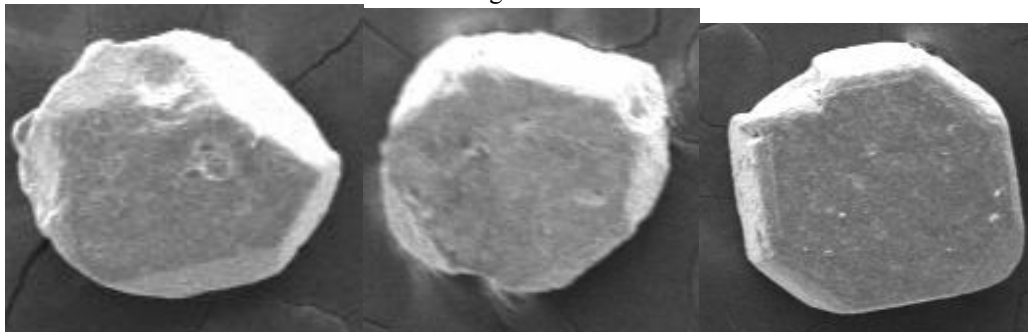


Figure 1. b

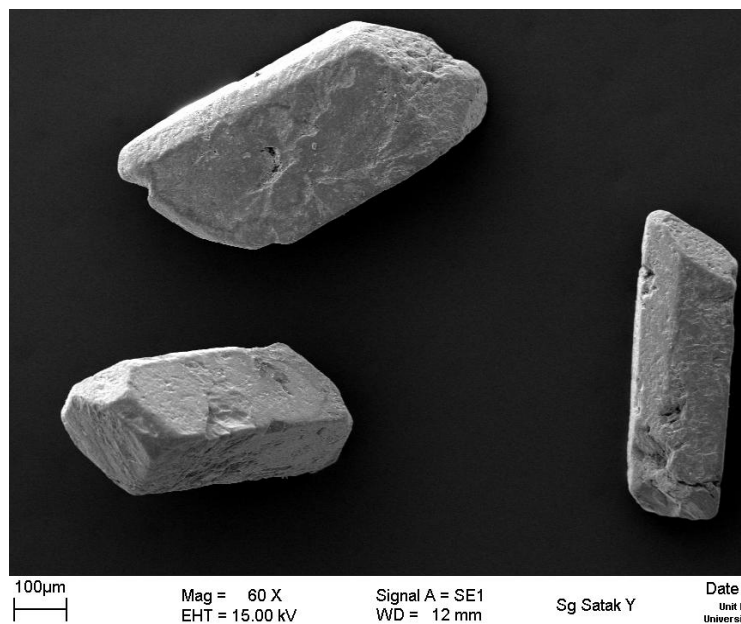


Figure 1. c

yellow and green grains are shown in Figures 2 and 3.

The dominant element present in monazite is oxygen, O with content ranging from 10.44% to 32.6 % followed by phosphorus with a range of 2.77% to 15.59 %. Three dominant rare earth element present are Ce (15.81% - 38.13%), Nd (5.89% - 13.50%) and La (0.00% - 20.42%). A number of accessory elements

detected are Fe, U, C, Ca, Ag, Al, Si, Th, Sm, Gd, Pt, Rb and Cs. The accessory elements are present in some of the samples only. Most notable among them are U, Th and Ca. Despite the fact that Pb, Th and U content were being fully utilized in age dating of rock using monazite (Grove & Harrison 1999, Timmermann 2000), the three elements are not always present in the Malaysian monazite. As shown by the results, Th is not a common

Table 1. Chemical composition of green monazite from Semiling and Bakri

Element	Semiling G 1		Semiling G 2		Bakri G 1		Semiling G 3	
	Wt %	At%	Wt%	At%	Wt%	At%	Wt%	At%
La	12.22	2.76	13.32	4.73	6.68	2.13	6.57	1.34
Ce	28.50	6.38	29.24	2.12	17.71	5.59	15.81	3.19
Nd	11.30	2.46	13.79	1.72	7.55	2.31	5.89	1.16
P	8.81	8.92	12.48	19.87	15.59	22.23	12.95	11.83
O	19.58	38.37	17.61	54.29	20.99	57.95	32.60	57.66
Fe	2.88	1.62	-	-	-	-	-	-
U	-	-	6.95	1.44	1.46	0.27	7.95	9.94
C	-	-	-	-	-	-	8.79	20.70
Ca	2.27	1.77	2.12	2.61	3.26	3.59	2.23	1.58
Ag	-	-	4.49	2.05	-	-	3.38	0.89
Al	-	-	-	-	-	-	-	-
Si	-	-	-	-	-	-	-	-
Th	-	-	-	-	18.37	3.50	-	-
Sm	-	-	-	-	4.25	1.25	2.01	0.38
Gd	-	-	-	-	2.57	0.72	1.81	0.33
Pt	-	-	-	-	1.19	0.27	-	-
Rb	-	-	-	-	0.38	0.20	-	-
Cs	-	-	-	-	-	-	-	-
	100		100		100		100	

Table 2. Chemical composition of yellow monazite from Semiling and Sungai Satak

Element	Semiling y 1		Semiling y 2		Sg Satak y 3		Semiling y 4	
	Wt%	Atm%	Wt%	Atm%	Wt%	Atm%	Wt%	Atm%
La	16.35	4.68	20.13	7.52	-	-	20.42	7.57
Ce	28.07	7.96	38.13	14.19	25.48	6.66	37.10	13.64
Nd	9.94	2.74	13.50	4.86	12.07	3.07	11.89	4.25
P	2.77	4.56	11.24	18.84	20.50	24.23	14.93	24.83
O	20.50	50.92	16.83	54.59	25.29	57.90	10.44	33.60
Fe	2.77	1.97	-	-	-	-	-	-
U	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	3.31	14.17
Ca	-	-	-	-	2.89	2.64	-	-
Ag	-	-	-	-	4.12	1.40	-	-
Al	9.69	14.26	-	-	0.65	0.89	0.50	0.96
Si	9.12	12.91	-	-	-	-	-	-
Th	-	-	-	-	-	-	-	-
Sm	-	-	-	-	1.93	0.47	0.91	0.32
Gd	-	-	-	-	2.88	0.67	-	-
Pt	-	-	-	-	-	-	-	-
Rb	-	-	-	-	-	-	-	-
Cs	-	-	-	-	2.83	0.78	-	-
	100		100		100		100	

element in monazite as only 1 in 8 sample contains Th with a content of 18.37 %. Uranium is also not common (3 in 8) containing 1.46 – 7.95 % U and it is detected only in the green monazite. Traces of Ca, C, Ag and Fe were also detected. Ca is present about 2-3 % in green monazite but not detected in the yellow variety. In all samples analysed, the dominant rare metal element is Ce,

indicating that all the analyzed monazite grains are monazite-Ce.

Comparing the green from yellow monazite in term its chemical composition, a significant difference would be the presence of Ca, which is present in 2- 3 % in all green monazite but not detected in the yellow variety. The presence of Ca may probably be the cause of the colour difference. Interaction of Ca with other

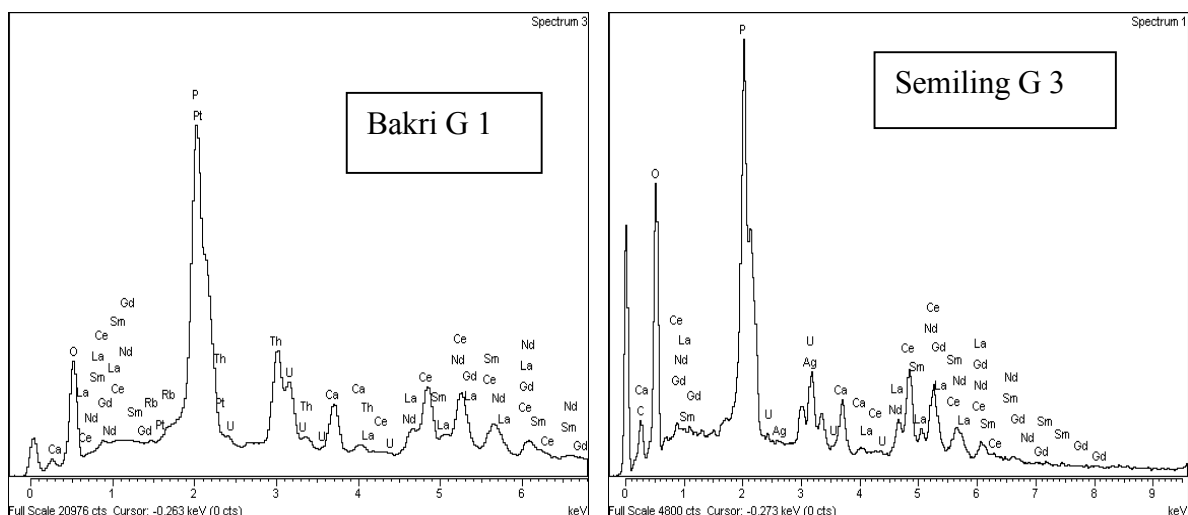


Figure 2. Compositional spectrograms of green monazites from Bakri and Semiling

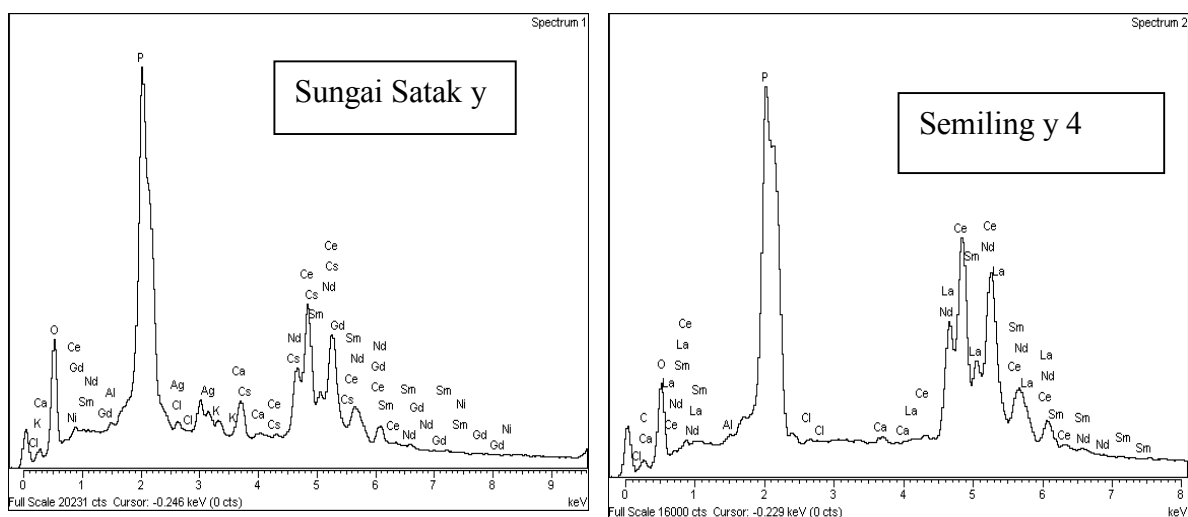


Figure 3. Compositional spectrograms of yellow monazite grains from Sungai Satak and Semiling

elements present perhaps alters the colour from brownish yellow to green.

5. Conclusion

From the present study, the following conclusions are derived:

- a) Malaysian monazite, like occurrences in other parts of the world, are monazite-Ce. Monazite-La and monazite Nd were not encountered.
- b) The REE composition of the monazite is not strongly connected to the crystal shape of the grains as the monazite-Ce observed in the samples can assume shapes of elongated rolled grains as well as the flattened shape.
- c) The colour difference of the monazite may probably be due to the presence of Ca and U in

the green variety as yellow monazite shows no presence of Ca and U.

6. Acknowledgement

The present writer wishes to thank the *Fakulti Sains dan Teknologi Universiti Kebangsaan Malaysia* for the permission and financial support rendered to attend this conference.

7. References

- Berry, L.G., B. Mason & R.V. Dietrich, 1951. *Mineralogi: konsep, pemeriharaan dan penentuan*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Ford, W.E., 1951. *Dana's textbook of mineralogy*, John Wiley and Sons. New York.
- Grove, M., & T.M. Harrison, Monazite Th-Pb age depth profiling. *Geology*, **27**(6), 1999, pp 487-490
- <http://webmineral.com/java/Monazite>

Wan Fuad Wan Hassan

- Timmermann, H., R.R. Parrish, S.R. Noble & R. Kryza., 2000. New U-Pb monazite and zircon data from the Sudetes Mountain in SW Poland: evidence for a single cycle Variscan. *Jour. Geol. Soc.*, **157**(2), 2000, pp 265-268.
- Wan Fuad Wan Hassan 1989. Some characteristics of the heavy detrital minerals from Peninsular Malaysia. *Geol. Soc. Malaysia, Bull* **24**, 1989; pp 1-12.

The effect of sorption competition between heavy metals in soils

Wan Zuhairi Wan Yaacob and Abdul Rahim Samsudin

Program Geologi, Pusat Pengajian Sains Sekitaran dan Sumber Alam
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM, Bangi, Selangor D.E.
E-mail: yaacobzw@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Laboratory batch experiments were carried out to study the competitive sorption behaviour of heavy metals (Pb, Cu, Ni and Zn) in five types of Malaysian soils, differing in their physicochemical properties; weathered metasediment from Air Hitam, Puchong (AHQ), river alluvium soils from Sg. Sedu (SSC), lateritic soils from Sg. Sedu (SSL) and Taman Beringin (TBL), and graphitic schist from Ampang Pechah (APS). The tests were carried out in two systems, i.e. single element solution and mixed solution of pure heavy metal nitrate salts. Soil AHQ possesses high sorption capacity compared to others in both systems. The sorption capacity of these soils, in both systems, for all the heavy metals can be ranked as follow: AHQ>SSC>SSL>TBL>APS. Pb has a better affinity for sorption in all soils compared to other heavy metals. Heavy metals were highly adsorbed in single solution compared to the mixed solution. This is due to the less competition for sorption sites in single system as compared to in the mixed system; i.e. competition among the heavy metals for sorption sites on the soil solid constituents in the mixed system.

Keywords: Competitive sorption, heavy metals, landfill, batch equilibrium test, soil

1. Introduction

Interest in the ability of soils to adsorb heavy metal (HM) ions has increased greatly in recent years. The sorption process is one of the most important processes influencing movement of contaminants into the groundwater systems. Sorption is the transfer of a solute from the aqueous phase to the solid phase of the soil. Soils have different capacity to adsorb heavy metals and are largely controlled by their physicochemical properties (Wan Zuhairi, 2000, 2001, 2003a, 2003b, and 2004). Clay contents, mineralogy, specific surface area, cation exchange capacity, and pH are among the properties that would affect the sorption capacity of soils on HMs.

In landfills, soils have been widely used as compacted soil liner and/or natural soil liner. This part of the landfill, which is called the bottom liner, plays very important role to prevent the movement of pollutants (HMs) from entering the groundwater system. The study was conducted to investigate the sorption

capacity of different soils on HMs and to research the effect of competition between these heavy metals on soil sorption behaviour. The study is important in estimating the HMs retention by soils and in order to elucidate the reaction mechanisms.

2 Experimental

Five soil samples were collected adjacent to active landfill sites in Selangor namely river alluvium and lateritic soils from Sg. Sedu Landfill (SSC and SSL respectively). Graphitic Schist from Ampang Pechah in Kuala Kubu Baru (APS), weathered metasediment of Kenny Hill Formation from Air Hitam in Puchong (AHQ) and finally lateritic soils from Taman Beringin in Gombak, Selangor (TBL) – see Figure 1. Lateritic soils are commonly used as an inert material to cover the compacted waste after each day of landfill operation. All samples were air dried and then pulverized to pass through 63 µm sieve.

Batch equilibrium tests were carried out using a



Figure 1. The sampling location map

standard method reported by USEPA (1992). The same procedure was also reported by Yong et al (1992), Yong (2001) and Wan Zuhairi (2000, 2003a, 2003b). According to Jessberger et al (1997), batch tests provide a quick method of estimating the sorption capacity of soils. In BET, 4g of soil was mixed with 40 ml of known concentration of tested solution, i.e. HMs. After 24 hours of agitation, soil and solution (supernatant) were then separated by centrifuging. The solution was then analysed using AAS to determine the concentration of HMs left in the solution. The concentration of HMs adsorbed by soils was then calculated using an equation below:

$$q = \frac{(C_o - C)V}{M}$$

Where,

q = the amount of contaminant removed from solution (mg/g)

C_o = the concentration of contaminant in the solution before mixing with soil (mg/L)

C = the equilibrium concentration of contaminant left in the solution after the experiment (mg/L)

V = volume of solution in the centrifuge tubes (40 ml)

M = mass of soil in the tubes (4g)

The test was carried out in two systems; (i) single element solution of Pb, Cu, Ni and Zn; and (ii) mixed solution containing all four elements (multi-cation condition). All solutions in both systems were prepared using nitrate salt with different concentrations ranging from 50-400 mg/L (50, 100, 200, 300

and 400 mg/l). Nitrate salts were chosen because of their poor ability to complex metallic cations.

3. Results and Discussions

Adsorption isotherms in single system (single element)

The adsorption of Pb in a single system for different samples is presented in Figure 2. The results show that the amount of Pb adsorbed from single $Pb(NO_3)_2$ solution increased with the equilibrium concentration of Pb in the solution. Soil AHQ adsorbed more Pb compared to other soils, with the maximum concentration of 2.1 mg/g; i.e. which is about 43% of the initial concentration of Pb ($C_o=484$ mg/L). Soil AHQ adsorbed 87% of the total Pb at the early stage of the test using lower concentration of Pb ($C_o=46$ mg/L). This indicates that at lower concentration, soil AHQ has extra free sorption sites and capable of receiving all Pb, i.e. the input Pb was below the adsorption capacity of this soil, which is very much depending on their cation exchange capacity, surface area, and other physicochemical properties. While at higher concentration, free sorption sites are only capable to accommodate some of the Pb ions and some are left free in the solution after equilibrium (i.e. all the available sorption sites are now saturated with Pb). Therefore, the sorption of HMs is highly active at lower concentration compared to at the higher concentration. According to Mohamed et al (1992) at low concentration, clay particles tend disperse due to the full development of the diffuse double layer, therefore clay particle surfaces in contact with the solution at the maximum. Meanwhile, the addition of HMs at higher concentration further enhanced the

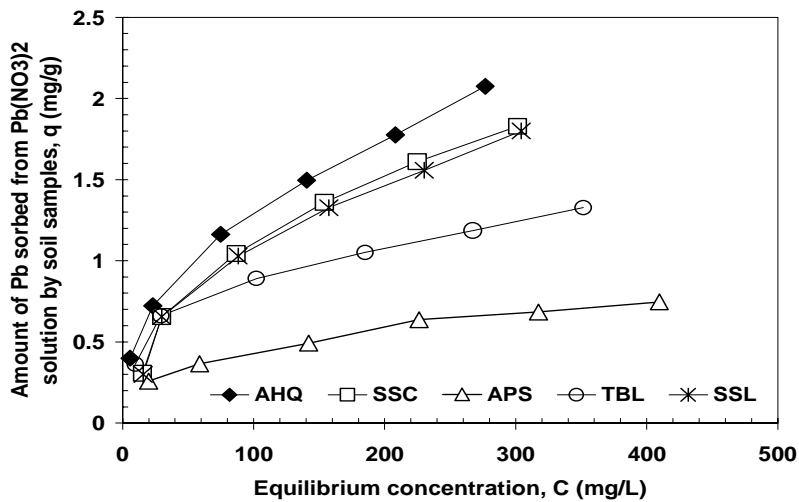


Figure 2. The amount of Pb adsorbed in single solution by all soil samples.

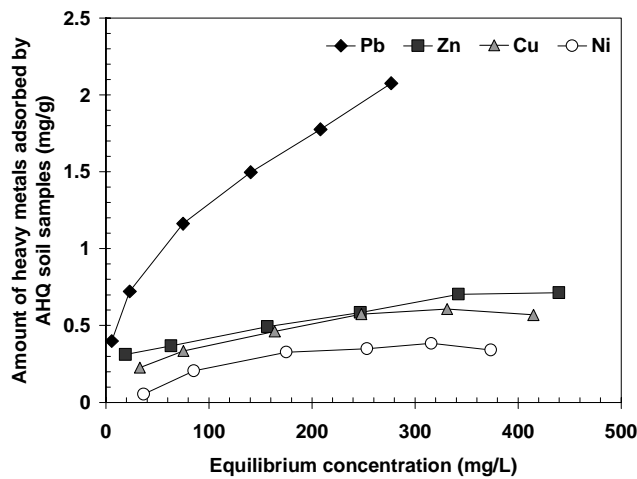


Figure 3. The affinity for sorption of heavy metals in single system (an example for AHQ soil).

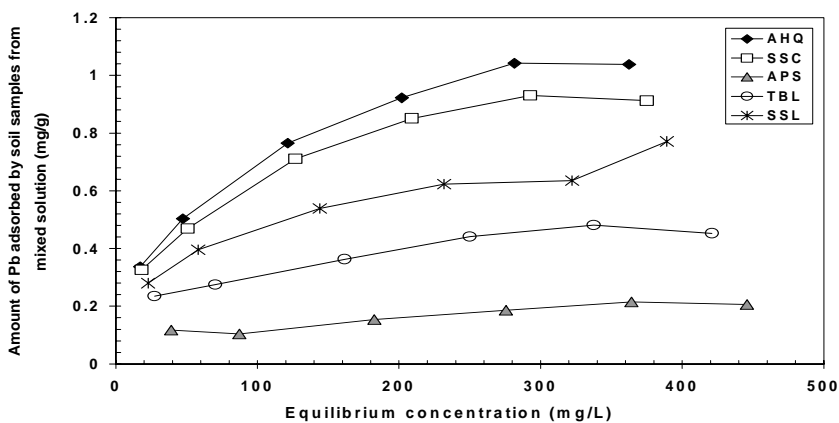


Figure 4. The amount of Pb adsorbed in mixed solution by all soil samples.

competition for exchange sites (Veeresh, et al 2003; Polcaro et al 2003). The sorption capacity for Pb in a single solution can be ranked as follow; AHQ>SSC>SSL>TBL>APS. The affinity of heavy metals for sorption also

varies, where Pb is highly sorbed compared to Zn, Cu and Ni. The affinity of heavy metals to be sorbed by all soil samples can be ranked as Pb> Zn ≈Cu >Ni.

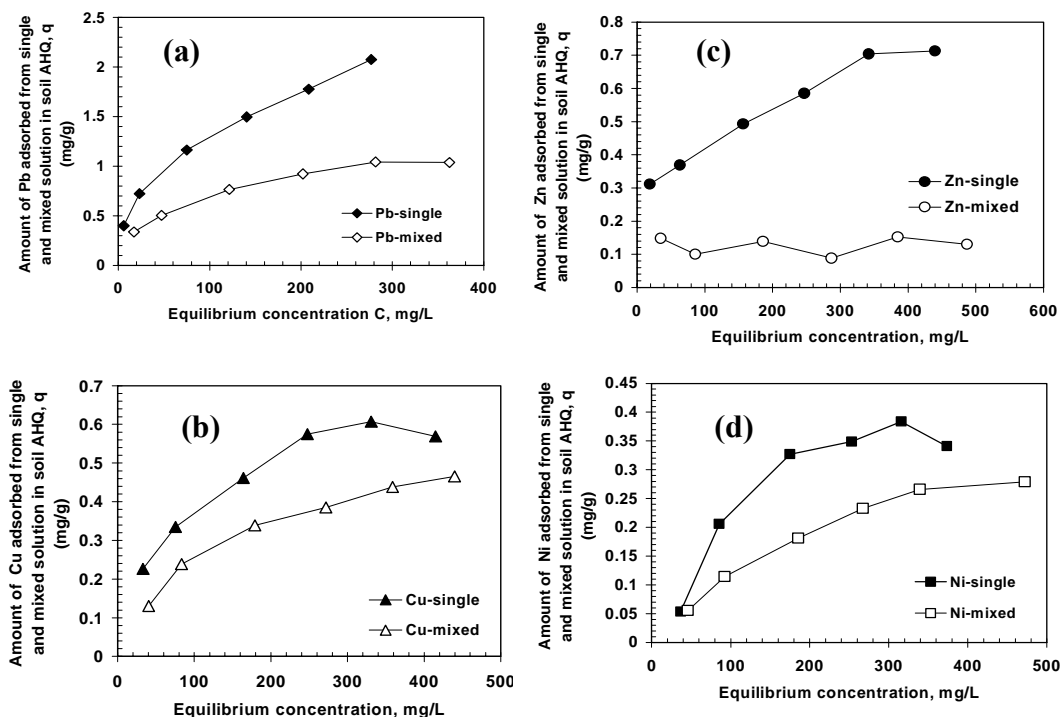


Figure 6. Effect of solution composition on the adsorption behavior of soils

Adsorption isotherm in mixed systems (multi-cation conditions)

The competition for sorption sites (i.e. onto the soil constituents) between multi-cations was investigated using the mixed nitrate solution. Figure 4 shows the Pb adsorption per unit weight of soil as a function of equilibrium lead concentration in the mixed solution for five different soils. The amount of Pb adsorbed in mixed system increased with the increasing equilibrium Pb concentration in the solution, until it reached a point where the sorption became constant. Soil AHQ showed the highest sorption capacity for Pb compared to other soils in the mixed system. At highest initial concentration of Pb in mixed solution ($C_0 = 466\text{mg/L}$), only 1.2mg/g of Pb was adsorbed, which is about 22.3 %. Soil APS showed the lowest sorption with the maximum sorption of only 0.2mg/g (at highest initial concentration of 466mg/L). The sorption capacity of these soil in a case for Pb in the mixed solution can be ranked as follow; $\text{AHQ} > \text{SSC} > \text{SSL} > \text{TBL} > \text{APS}$.

The affinity of heavy metals for sorption is presented in Figure 5. Pb showed the highest sorbed compared to other elements. Zn is the lowest sorbed. The affinity sequence of HMs for sorption (in AHQ soil only) can be ranked

as $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn}$. There is a slight difference in the affinity for HMs sorption in both systems. The reason for this phenomenon was probably due to different solutions used in the study, i.e. single and mixed solution. In general, the results obtained from this study are in agreement with those reported by Elliot et al (1986) and Echeverria et al (1998), which showed that Pb and Cu metal adsorption is much greater than Ni and Zn sorption.

We have seen the difference of HMs sorption behaviour in two different systems; i.e. single HM solution and mixed HMs solution. The results have shown that HMs are predominantly adsorbed in single system compared to mixed system. Figure 6 (a-d) shows the comparison between the amounts of Pb, Cu, Ni and Zn adsorbed in both systems (single and mixed) in AHQ soil. In the case for Pb (Figure 6a), the amount of Pb adsorbed in a single system, which was about 2.1mg/g , is higher than in a mixed system, which was only 0.9mg/g (both at the same initial concentration of $\sim 500\text{mg/L}$). This is attributed primarily by the competition for sorption between these four elements when they are put in one solution. This seems to correspond with the data reported by Frost and Griffin (1977), where they concluded that the decrease in sorption was due to competition for

cation exchange sites caused by the high levels of cation present in the mixed solution. The cations (Pb, Cu, Ni and Zn) in the multi-ion solution competed with each other for the available cation exchange site.

This phenomenon can also be observed in other HMs as depicted in Figures 6b, 6c and 6d. The difference of HMs sorption in both solutions would give information of the behaviour of HMs in the real leachate (i.e. field condition). We can expect that the sorption of HMs in the landfill leachate would be much lower due to the competitiveness for sorption sites between various pollutants in leachate.

4. Conclusions

The study has revealed that the sorption behaviour of heavy metals in single system is difference compared to in the mixed solution. The amount of HMs sorbed in a single system is higher than the amount sorbed in the mixed system due to the competition between HMs for sorption sites at the surfaces of soil components. The study suggests that competition exists between solutes at equilibrium with the solid phase, especially for high solute concentrations (i.e. higher competition among HMs at higher concentration). Soils have different capacity for sorption. The study also revealed that soil AHQ has a better capacity for sorption compared to other soils. The sorption capacity for these soils in both systems can be ranked as; AHQ>SSC>SSL>TBL>APS. HMs have different affinity for sorption. Pb has higher affinity for sorption compared to others. The sorption affinity of HMs differ in both systems as shown by this study and can be ranked as follow: Pb> Zn ≈Cu >Ni (single system) and Pb>Cu>Ni>Zn (mixed system).

5. Acknowledgements

This study is part of the project funded by IRPA No. 08-02-02-0008-EA178 and UKM's Short Grant S/27/2000. Special thanks to Mr. Yaacob Othman for his technical help with AAS.

6. References

Elliot, H.A., Liberati, M.R., and Huang, C.P. 1986. Competitive adsorption of heavy metals by soils. *Soil Sci Soc Am J.* 46:1153-1158.

Echeverria, J.C., MOrera, M.T., Mazkieran, C. and Garrido, J.J.1998. Competitive sorption of heavy

metals by soils. Isotherms and fractional factorial experiments. *Environ Pollut.* 101:275-284.

Frost, R.R. and Griffin, R.A., 1977. Effect of pH on Adsorption of Cooper, Zinc and Cadmium from Landfill Leachate by Clay Minerals. *Journal of Environmental Science and Health.* A12 (4&5), pp. 139-156.

Jessberger, H.L., Onnich, K., Finsterwalder, K., and Beyer, S. 1997. Experimental and numerical studies of contaminant transport through mineral liners and resulting improvements in liner materials. In. *Advanced Landfill Liner System.* Ed. August, H., Holzlohner, U., and Meggyes, T. Thomas Telford: London

Mohamed, A.M.O, Yong, R.N., Tan, B.K., Farkas, A., and Curtis, L.W. (1992). Geo- Environmental Assessment of a Micaceous Soil for its Potential Use as an Engineered Clay Barrier. *Geotechnical Testing Journal, ASTM,* 17 (3): 291-304.

Polcaro, A.M., Mascia, M., Palmas, S., Vacca, A., and Tola, G. 2003. Competitive sorption of heavy metals ions by soils. *Environmental Engineering Science.* 20 (6):607-616.

Usepa (1992). *Batch-Type Procedures for Estimating Soil Adsorption of Chemicals, EPA/530/SW-87/006-F.* Washington, D.C. : US Environmental Protection Agency.

Wan Zuhairi W.Y. 2000. *An investigation of natural attenuation characteristic of natural clay soils from South Wales and their potential use as engineered clay liner.* Thesis Doctor of philosophy (Ph.D.). Cardiff University (*unpublished*)

Wan Zuhairi, W.Y. 2001. Soils Suitability for Landfill Liner Material Based on Their Physico-Chemical Properties: A Case Study from South Wales, United Kingdom. *Majalah Geologi Indonesia (MGI – Special Edition ISSN 0216-1061), Vol. 16:* 115-122.

Wan Zuhairi W.Y. 2003a. Sorption capacity on lead, copper and zinc by clay soils from South Wales, United Kingdom. *Journal of Environmental Geology,* 45(2): 236 - 242.

Wan Zuhairi, W.Y. 2003b. Heavy Metal Sorption Capabilities of some Soil Samples from Active Landfill Sites in Selangor. *Geological Society of Malaysia, Bulletin 46,* pp 295-297.

Wan Zuhairi, W.Y., Abdul Rahim Samsudin, Mohd Ramziemran & Chan Yik Loon. 2004. Natural Sorption Capability of Heavy Metals: Granitic Residual Soil from Broga and Marine Clay from Sg. Besar Selangor. *Geological Society of Malaysia, Bulletin 48,* pp. 13-16.

Veeresh, H., Tripathy, S., Chaudhuri, D., Hart, B.R. and Powell, M.A. 2003. Competitive adsorption

Wan Zuhairi Wan Yaacob and Abdul Rahim Samsudin

behaviour of selected heavy metals in three soil types of India amended with fly ash and sewage sludge. *Environmental Geology*. 44:363-370.

Yong, R.N., Mohamed, A.M.O & Warkentin, B.P. 1992. *Principles of Contaminant Transport in Soils*. Elsevier, New York.

Yong, R. N. 2001. Contaminated soils, pollutant fate and mitigation. CRC press, New York.

Chemotaxonomic implication of the oligostilbenes and phenolic derivatives from *Vatica odorata*

Wan Zuraida Wan Mohd. Zain¹⁾, Sjamsul A. Achmad²⁾, Euis H. Hakim²⁾, Jalifah Latip¹⁾,
Nik Idris Nik Yusof³⁾ and Yana M. Syah²⁾

¹⁾ School of Chemistry and Food Technology, Faculty of Science and Technology, National University of Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

²⁾ Department of Chemistry, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia.

³⁾ MBH Manufacturing & Marketing Sdn. Bhd. Lot 18, Jalan Modal 23/2, Kawasan Miel, Fasa 8, 4000 Shah Alam, Selangor.

Abstract

Four oligostilbenes, i.e. (-)- ϵ -viniferin (**1**), laevifonol (**2**), (-)-hopeaphenol (**3**), vaticanol B (**4**), one stilbene glucoside resveratrol-13-O-glucopyranoside (**5**), and one gallic acid derivative bergenin (**6**), were isolated from the acetone and MeOH extracts of the tree barks of *V. odorata*. The structures of compounds **1-6** were established on the basis of their spectral data, including UV, IR and NMR spectra, in comparison with the previously reported data and by the result of X-ray crystallography analysis for compound **6**. The presence of these metabolites in *V. odorata* suggested a close chemotaxonomic relationship between this plant with *V. umbonata* and *V. rassak*.

Keywords: *Vatica umbonata*, *Dipterocarpaceae*, oligostilbenes, chemotaxonomy.

1. Introduction

Vatica (Dipterocarpaceae) is a relatively large genus distributed mainly in Southeast Asia (Symington, 1974). The plants belonging to this genus, as well as other dipterocarp genera such as *Hopea*, *Shorea*, and *Vateria*, have been known to be a rich source of oligostilbenes derived from resveratrol (4,3',5'-trihydroxystilbene) (Sotheeswaran and Pasupathy, 1993; Hakim, 2002; Zgoda-Pols et al., 2002; Ito et al., 2003a; 2003b). They include dimer, trimer, tetramer, hexamer, heptamer, and octamerstilbenes. Recently, a chemotaxonomic implication of the oligostilbenes isolated from *Vatica* species has been discussed. We now report the isolation and identification of oligostilbenes from another species, *V. odorata* (Griff.) Sym., and discuss their chemotaxonomic significance.

2. Experimental

General experimental procedures

UV spectra were measured with a Varian Conc. 100 instrument. IR spectra were determined

with a Perkin Elmer FTIR Spectrum One spectrometer using KBr pellets. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a JEOL ECP400 operating at 400 (¹H) and 100 (¹³C) MHz using residual and deuterated solvent peaks as reference standards. Vacuum liquid (VLC) and column chromatography were carried out using Merck silica gel 60 GF₂₅₄ and silica gel G60 35-70 mesh. For TLC analysis, precoated silica gel plates (Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄, 0.25 mm) were used.

Plant materials

Samples of the tree barks of *V. odorata* were collected from Pulau Mata Kail, Perak, Malaysia. The identity of the plant was determined by UPM botanist and the voucher specimen SK 626/03 was deposited at the Herbarium Biosciences Centre, University Putra Malaysia.

Extraction and isolation

The dried powder of the tree barks of *V. odorata* (0.45 kg) was macerated successively

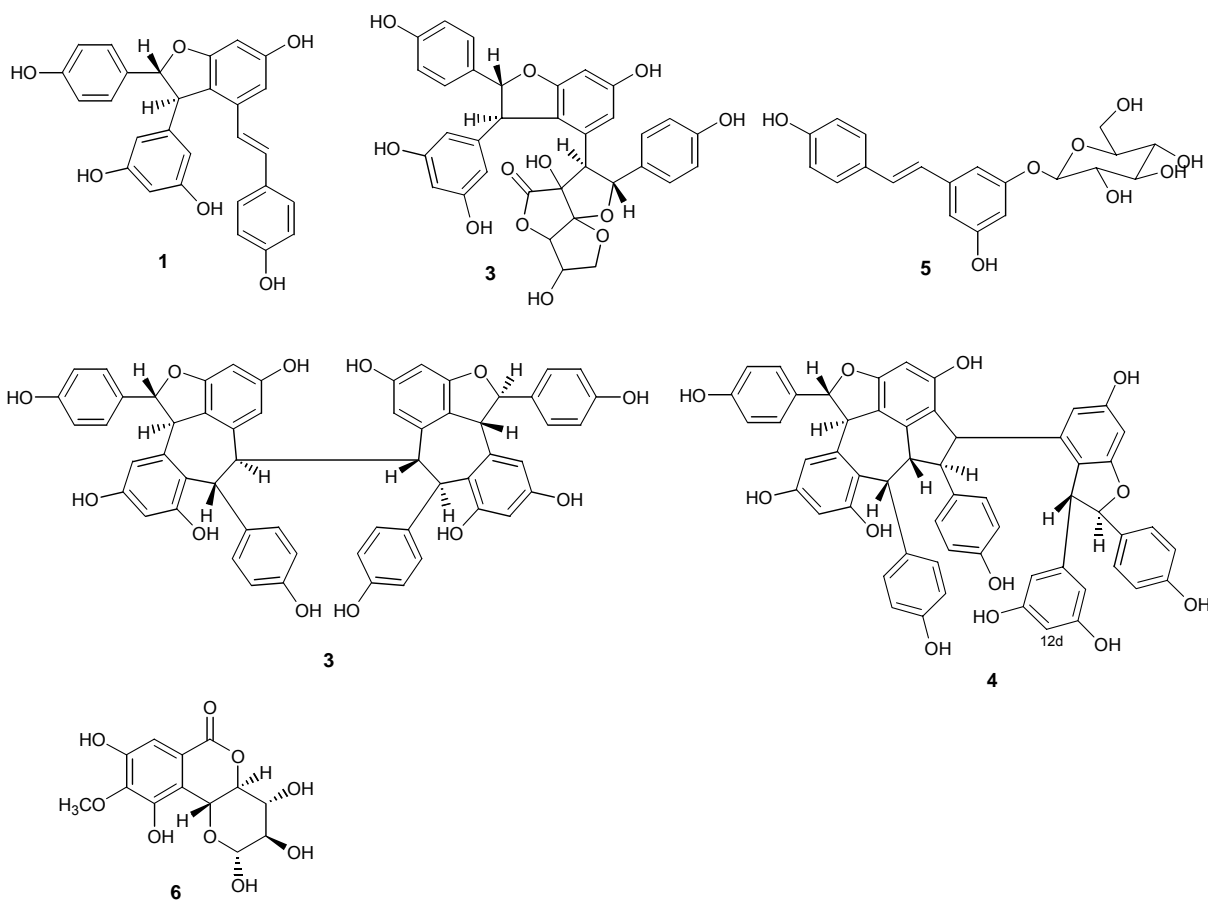
with acetone and MeOH at room temperature to give acetone (27 g) and MeOH (11 g) extracts, respectively. A part of the MeOH extract (20 g) was fractionated using liquid vacuum chromatography technique (silica gel 150 g) eluted with (each 150 ml) *n*-hexane-EtOAc of increasing polarity to give five major fractions A-E. Fraction B (2.2 g) was purified with flash and radial chromatography (silica gel) eluted with *n*-hexane-EtOAc and CHCl₃-MeOH, respectively, afforded ϵ -viniferin (315 mg) (**1**), and vaticanol B (100 mg) (**4**). Purification of fraction E using the same method gave hopeaphenol (60 mg) (**3**) and laevifonol (40 mg) (**2**). Also, using the same methodology, fractionation and purification of the acetone extract gave bergenin (12 mg) (**6**) and resveratrol-13-*O*-glucopyranoside (25 mg) (**5**).

The structure of compounds **1-6** was elucidated based on spectroscopic data, including UV, IR, and NMR spectra (data not shown here), as well as by comparison with the those reported data, to be ϵ -viniferin (**1**), laevifonol (**2**),

hopeaphenol (**3**), vaticanol B (**4**), resveratrol-13-*O*-glucopyranoside (**6**), and bergenin (**5**), respectively. Compound **5** was also confirmed by analysis of X-ray chrystallograpy.

3. Results and discussion

Four oligostilbenes, *i.e.* (-)- ϵ -viniferin (**1**) (Oshima *et al.*, 1995), laevifonol (**2**) (Hirano *et al.*, 2003), (-)-hopeaphenol (**3**) (Cogon *et al.*, 1972), vaticanol B (**4**) (Tanaka *et al.*, 2000), one stilbene glucoside resveratrol-13-*O*-glucopyranoside (**5**), and one gallic acid derivative bergenin (**6**), were isolated from the acetone and MeOH extracts of the tree barks of *V. odorata*. The isolation of these compounds was carried out with several chromatographic methods (vacuum liquid, flash, and radial chromatography) on silica gel eluted with various solvent systems. The structures of compounds **1-6** were established on the basis of their spectral data, including UV, IR and NMR spectra, in comparison with the previously reported data and by the result of X-ray chrystallograpy analysis for compound **6**.



(-)- ϵ -Viniferin (**1**), a dimerstilbene, is regarded as the general precursor for the oligostilbenes and, thus, has no chemotaxonomic significance. The isolation of laevifonol (**2**) in *V. odorata* is the second time for its presence in *Vatica* species. This compound is a unique oligostilbene formed from a condensation between **1** and ascorbic acid, and was firstly isolated from *Shorea laevifolia* (Hirano *et al.*, 2003) and recently from *V. umbonata* (Atun *et al.*, 2005). Vaticanol B (**4**), a tetramerstilbene, had been reported previously to occur in *V. rassak* (Tanaka *et al.*, 2000) and also in *V. umbonata* (Atun *et al.*, 2005). The presence of compounds **2** and **4** in *Vatica* species could be of chemotaxonomic significance. In addition, the presence of (-)-hopeaphenol (**3**) in this plant is also interesting, particularly for the relationship between *Vatica* and other dipterocarp genera, given the fact that this compound has been found in many dipterocarpaceous plants, including the species of *Hopea*, *Neobalanocarpus*, *Shorea*, *Stemonoporus*, and *Vateria* (Sotheeswaran and Pasupathy, 1993; Hakim, 2002; Zgoda-Pols *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2003a; 2003b). More specifically, all the oligostilbenoids **1-4** are also the metabolites of *V. umbonata*, and thus points to the close relationship between *V. odorata* and *V. umbonata*. It is also interesting to note that the presence of compound **2** in both *Vatica* species highlights the importance of this compound in the chemotaxonomy of *Vatica* and its relationship with other genera of Dipterocarpaceae, in particular with *Shorea*. Compound **5**, a 13-*O*-glucoside of resveratrol, is very limited distribution in dipterocarp plants, while compound **6**, a *C*-glucoside derivative of gallic acid, has been known to occur in several species of *Shorea*.

4. Conclusions

Four oligostilbenes, *i.e.* (-)- ϵ -viniferin (**1**), laevifonol (**2**), (-)-hopeaphenol (**3**), vaticanol B (**4**), one stilbene glucoside resveratrol-13-*O*-glucopyranoside (**5**), and one gallic acid derivative bergenin (**6**), were isolated from the acetone and MeOH extracts of the tree barks of

V. odorata. The presence of these metabolites in *V. odorata* suggested a close chemotaxonomic relationship between this plant with *V. umbonata* and *V. rassak*.

5. Acknowledgement

The authors would like to thank PUSPA, Faculty Sciences & Technology, UKM and Chemistry Department, ITB for awarding a two months student exchange study-visit at ITB for WZWMZ. And also thanks to MBH Manufacturing & Marketing Sdn. Bhd. for their support.

6. References

- Atun, S., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Makmur, L., Syah, Y.M., 2004. *Biochem. Sys. Ecol.* 32, 1051-1053.
- Cogon, P., Mc Phail, A.T., Wallwork, S.C., 1972. *J. Chem. Soc. (B)*, 884-897.
- Hakim, E.H., 2002. *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)* 2, 1-19.
- Hirano, Y., Kondo, R., Sakai, K., 2003. *Japan Wood Sci.* 49, 53.
- Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Nakaya, K., Takahashi, Y., Sawa, R., Naganawa, H., Chelladurai, V., 2003a. *Tetrahedron* 59, 1235-1264.
- Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., Ilya, I., Nakaya, K., Ali, Z., Takahashi, Y., Sawa, R., Shirataki, Y., Murata, J., Darnaedi, D., 2003b. *Tetrahedron* 59, 5347-5363.
- Oshima, Y., Kamijou, A., Ohizumi, Y., Niwa, M., Ito, J., Hisamichi, K., Takeshita, M., 1995. *Tetrahedron* 51, 11979-11986.
- Sotheeswaran, S., Pasupathy, V., 1993. *Phytochemistry* 32, 1083-1092.
- Symington, C.F., 1974. *Foresters' manual of dipterocarps*. Penerbit Universiti Malaya, Kuala Lumpur.
- Tanaka, T., Ito, T., Nakaya, K., Iinuma, M., Riswan, S., 2000. *Phytochemistry* 54, 63-69.
- Zgoda-Pols, J.R., Freyer, A.J., Killmer, L.B., Porter, J.R., 2002. *J. Nat. Prod.* 65, 1554-1559.



The Effect of Palm Oil Vitamin E Supplementation on DNA Damage and Certain Immune Parameters in the Ageing Population

Wan Zurinah Wan Ngah¹, Noor Aini Abdul Hamid¹, Azian Abdul Latiff², Zaiton Zakaria³, Musalmah Mazlan¹, Johari Ibahim¹, Chin Siok Fong¹, Aminuddin Abdul Karim³

Department of Biochemistry, Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, 50300 Malaysia
e-mail: zurinah@medic.ukm.my

2) Department of Anatomy, Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, 50300, Malaysia
e-mail: azian@medic.ukm.my

3) Department of Physiology, Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, 50300, Malaysia
e-mail: zaitonz@medic.ukm.my

Abstract

The free radical theory of ageing has been widely accepted where ageing occurs as a result of oxidative stress leading to detrimental accumulation of damage to cellular components. Antioxidants have therefore been suggested to be protective. The objective of this study is to evaluate the effects of 6 months Tri E (vitamin E extracted from palm oil containing 60% tocotrienols and 40% tocopherols) supplementation on certain immune parameters and DNA damage in the healthy adult. A single blind, placebo controlled trial was conducted in healthy subjects age 35-70 years old with fasting blood collected at 0, 3 and 6 months of supplementation where subjects received either Tri E capsule (160mg/d) or placebo. After obtaining informed consent, fasting blood samples (18 ml) were taken from 24 healthy individuals who passed the screening test. No significant differences in lymphocyte percentage, CD4⁺, CD8⁺, B cell, natural killer cells and CD4/CD8 ratio was observed between the two groups. Endogenous antioxidant defense measured by the determination of erythrocyte super oxide dismutase (SOD) was found to increase while glutathione peroxidase (GPx) was unchanged with supplementation. HDL increased after 6 months ($p < 0.05$) supplementation while alanine transaminase (ALT) although within normal range was decreased after 3 and 6 months ($p < 0.05$). A significant increase in the number of undamaged DNA ($p < 0.05$) and decrease in mildly damaged DNA ($p < 0.05$) as measured by comet assay were observed after 6 months of supplementation. In conclusion, the results suggest that vitamin E supplementation did not alter the lymphocyte subset parameters and had no effect on immune response. However, it is interesting to note that vitamin E supplementation maybe beneficial by causing increases in HDL, SOD levels while decreasing ALT enzyme activity and levels of DNA damage.

Key words: Ageing, Correlation, Free Radical, Immune Response, Oxidative Stress.

1. Introduction

The ageing process is attributed to the accumulation of oxidative damage to cells and tissues, associated with a progressive increase in morbidity and mortality (Junqueira *et al.*, 2004). Although several theories have been suggested to explain the aging process, the free

radical theory of ageing (FRTA) has been more generally accepted from the large amount of data available which correlates the oxidant status of the organism with the ageing process. FRTA suggested that decreasing free radicals and the corresponding oxidative stress will decrease the changes that lead to ageing, alter

the ageing rate and subsequent disease risk and pathogenesis.

In addition, ageing has been reported to relate to increasing oxidative stress levels. Oxidative stress is characterized by the imbalance between oxidant production and antioxidant defense in cells where oxidant production is higher than antioxidants (Halliwell, 1991). This imbalance will result in an increase in the aging process (Sohal & Allen, 1985). Oxidative status is determined by measuring antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, and natural antioxidants such as α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene and α -lipoic acid. Human studies are limited due to the high cost involved and logistic problems but needs to be done. There is also limited information on these antioxidant enzymes in the literature.

A strong positive correlation has been identified between maximum life span and concentrations of antioxidants such as tocopherol in plasma. As free radical reactions have been indicated as the cause of ageing and many age-related degenerative diseases, nutritional supplementation especially with antioxidants are promoted for health benefits and increasing longevity. As such, interest has focused on the potential health benefits of vitamin E from palm oil that has been reported to contain a high percentage of tocotrienols as well as tocopherols.

Generally, reports on the relationship between age and the accumulation of products of oxidative damage to proteins, lipids and nucleic acids are limited. It is also suggested that an imbalance between the pro oxidant, antioxidant and recovery, substitution or impaired biological protein will influence the ageing process. The objectives of this study are to determine the effects of six months vitamin E (Tri-E) supplementation on immune response, enzymes SOD and GPx and DNA damage as measured by the comet assay.

2. Materials and Methods

A single blind, placebo controlled study was carried out where inclusion criteria are subjects do not smoke or drink alcohol, or on any medication or take vitamin supplements, free from any chronic diseases and are not pregnant. Subjects were divided into two groups where one group received Tri E capsule (160mg/day)

supplementation and the second group receive placebo. In this report, a total of 10 subjects for group 1 and 14 subjects for group 2 have been recruited. Ethical approval was obtained from the Research and Ethics Committee of the Medical Faculty, UKM. Informed consent was obtained from the subjects. Fasting blood (18ml) was taken from each subject who fulfills the inclusion criteria. Their medical history and background details were taken and they were required to answer a food frequency questionnaire and to undergo a full physical examination.

Monoclonal antibodies were used to determined subpopulations of lymphocyte including T cells, cells positive to CD3 surface antigen; T cytotoxic/suppressor, cells positive for CD 8 surface antigen: and B cells, cells positive for CD19 cell surface antigen. 2 ml venous bloods were collected in EDTA tubes and thoroughly mixed. 20 μ l of monoclonal antibody conjugate (Becton Dickinson) was placed at the bottom of tubes as follows CD4, CD8, CD19 and CD16+56 and 50 μ l of whole blood were added, vortexed gently and were incubated for 15 minutes in the dark at 4°C. RBCs were lysed using 0.5 ml FACS lysing solution and incubated 10 minute at room temperature in the dark. Data were acquired using FACSCAN flow cytometer (Becton Dickinson) and simulSET® programme.

Comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with slight modifications. Fully frosted microscope slides were precoated with a layer of 0.6% normal melting point agarose at about 50°C. They were covered with cover slips to flatten out the molten agarose layer and chilled to enhance gelling of the agarose. The following operations were performed under dim light to prevent further DNA damage. Blood samples were suspended in 0.6% low melting points agarose in PBS, pH 7.4. After removing the cover slips from the slides, the cell suspensions were pipetted onto the first agarose layer at about 37°C and cover slips were applied once again. The LMP agarose was allowed to solidify on an ice-cold flat tray. After removal of the cover slips, the slides were immersed into ice-cold lysing solutions (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris at pH 10, 1% Triton X-100, 1% sodium N-lauroyl sarcocinate, 10% DMSO) at 4°C for 1

hour to remove cellular protein. Slides were then placed horizontally in an electrophoresis tank containing 0.3 M NaOH and 1mM EDTA at 4°C for 20 minutes to allow the alkaline unwinding. Electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 minutes. The slides were then washed three times for 5 minutes each with a neutralizing solution (0.4M Tris, pH 7.5) before staining with 20 µl/ml of Ethidium Bromide. Cover slips were placed on the top and the slides were placed in a humidified container to prevent drying of the gel and they were analyzed as soon as possible or within 24 hours.

Visual analyses of DNA damage were carried out in accordance with the protocols of Kobayashi *et al.* (1995). Slides were examined at 200x magnification using a fluorescence microscope. 500 randomly selected non-overlapping cells on each slide were analyzed, assigning a score on an arbitrary scale of 0-4 ranging from 0 of no DNA damage to 4 of extensive DNA damage based on perceived comet tail length migration and relative proportion of DNA in the comet tail. The five classes of DNA damage were further categorized into 3 grades as normal (score 0: undamaged, no migration), mild damage (score 1 & 2: limited migration) and extensive damage (score 3 & 4: DNA pieces migrate freely into the tail).

SOD activity in erythrocyte was determined according to the method of Beyer and Fridovich (1987). This method is based on the inhibitory effect of SOD on nitro blue tetrazolium (NBT) reduction by O_2^- generated by the action of xanthenes oxidase on xanthenes. The reduction of NBT was measured at 550 nm. One SOD unit was defined as the enzyme activity required to inhibit the rate of NBT reduction by 50 % in 1 min.

GPx activity was determined according to Paglia and Valentine (1967). GPx catalyzes the oxidation of GSH by tert-hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH, GSSG is immediately converted to GSH with a concomitant oxidation of NADPH to $NADP^+$. The decrease in absorbance at 340 nm was measured. One GPx unit was defined as the enzyme activity necessary to convert 1 µmol NADPH to $NADP^+$ in 1 minute.

Data obtained were analyzed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 11.5 version.

3. Results and Discussion

A total of 24 subjects have so far completed the 6 month supplementation and their profile are shown in Table 1. Subjects are all female and Malay.

The results of the comet assay showed that supplementation with Tri-E significantly increased the amount of undamaged DNA while reducing the amount of damaged DNA after 6 months (Figure 1). However, analysis of the results obtained showed that the amount of damaged DNA did not significantly increase with increasing age probably due the small number of subjects studied so far. Antioxidant status reflects the balance between antioxidant defenses and free radicals within the body (Heaton *et al.*, 2002). The association of oxidative stress with DNA damage has been demonstrated in animal studies. As such, maintaining a balanced antioxidant status and reducing levels of oxidative stress have been suggested as a method to reduce damage to DNA.

A study by Duthie *et al.* (1996) demonstrated a protective effect of antioxidant supplementation towards oxidative DNA damage in human lymphocytes. It has also been reported that supplementation with a combination of Vitamin A, C and E resulted in a significant decrease in the levels of all modified DNA bases caused by oxidative stress (Jaruga *et al.*, 2002).

Reports on the antioxidant enzyme activities in humans have so far showed variable results. Our results showed that SOD activity increased significant ($p < 0.05$) (Figure 2) after 6 months supplementation while GPx activity was unaffected (Figure 3). SOD is reported to be the first line enzymatic antioxidant defense which catalyses the dismutation of highly reactive superoxide anion into H_2O_2 that is converted to H_2O by GPx and CAT (Cheng *et al.*, 2001). Antioxidant enzymes function with vitamin E to defend the cell against free radical attack which increased in aging.

Table 2: Lipid profile between placebo group and vitamin E group at 0, 3 and 6 months supplementation.

Our results showed that 6 months of vitamin E supplementation caused HDL to increase compared to the placebo group. Since our subjects are healthy individuals, the total cholesterol levels are within the normal range and supplementation did not alter the level of total cholesterol although there were tendency for the LDL levels to decrease. A study in hypercholesterolemic subjects have shown that dietary supplementation of 200 mg/day tocotrienol rich fraction (TRF) caused a significant reduction of total cholesterol and LDL and increased HDL slightly (Qureshi *et al.*, 1991). It is suggested that vitamin E reduced the HMG CoA activity that regulates the synthesis of cholesterol.

The results of the liver function tests showed that while all other parameters remained unchanged the alanine transaminase enzyme (ALT) was significantly reduced. ALT is an indicator of liver cell turnover and a reduction in this enzyme is indicative of hepatoprotection.

Result showed no significant different ($p < 0.05$) in both groups.

No significant difference was observed in the lymphocyte percentage, CD4⁺, CD8⁺, B cell, natural killer cells and CD4/CD8 ratio between the vitamin E supplemented and placebo groups (Table 4). Meydani *et al.* (1989) reported that vitamin E supplementation increased lymphocyte proliferation response to Con A, delayed type hypersensitivity and decreased PGE₂ production.

4. Conclusion

In conclusion, the result suggests that vitamin E supplementation maybe beneficial by causing increases in HDL and SOD levels while ALT enzyme activity is decreased and levels of DNA damage. However, the lymphocyte subset parameters were not affected by vitamin E supplementation.

5. Acknowledgement

The research was funded by the Malaysian government through the IRPA 06-02-02-0016/PR0008/09-01 grant and Universiti Kebangsaan Malaysia.

6. References

Beyer W.F. & Fridovich I., (1987). Assaying for Super Oxide Dismutase Activity: Some Large

Consequences of Minor Changes in Condition, *Analytical Biochemistry.*, **161**: 559 – 316.

Cheng T.Y., Zhu Z., Masuda S., Orcos N.C., (2001). Effects of Multinutrient Supplementation on Antioxidant Defense Systems in Healthy Human Being, *Jour. Nutr. Biochem.*, **12**: 388 -395.

Duthie S.J., Ma A.G., Ross M.A., Collins A.R., (1996). Antioxidant Supplementation Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes, *Cancer Res.*, **56**: 1291-1295.

Halliwell B., (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems; Source, Biochemistry and Role in Human Disease, *Am.J.Med.*, **91**(3C): 14-22.

Heaton P.R., Ransley R., Charlton C.J., Mann S.J., Stevenson J., Smith, B.H.E., Rawlings, J.M., Harper E.J., (2002). Application of Single-cell Gel Electrophoresis (comet) Assay for Assessing Levels of DNA Damage in Canine and Feline Leukocytes. Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of Age.

Jaruga P., Jaruga B., Gackowski D., Olczak A., Halota W., Pawlowska M., Olinski R., (2002). Supplementation with Antioxidant Vitamins Prevents Oxidative Modification of DNA in Lymphocytes of HIV-infected Patients, *Free Radical Biology & Medicine.*, **32**: 414-420.

Junqueira B.C., Barros B.M., Chan S.S., Rodrigues L., Giavarotti L., Abud R.L., Deucher, G.P., (2004). Aging and Oxidative Stress., *Molecular Aspects of Medicine.*, **25**: 5-16.

Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T., (1995). A Comparison between Manual Microscopic Analysis and Computerized Image Analysis in the Single Cell Gel Electrophoresis Assay, *MMS Commun.*, **3**(2): 103-115.

Meydani S. N., Meydani M., Barklund P. M., Liu S., Miller R. A., Cannon J. G., Rocklin R., Blumberg J. B., (1989). Effect of Vitamin E Supplementation on Immune Responsiveness of the Aged, *Ann. NY. Acad. Sci.*, **570**: 283 – 290.

Paglia D.E & Valentine W.N., (1967). Studies on the Quantitative and Qualitative Characterizations of the Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, **70** (1): 158 – 169.

Qureshi A.A., Qurhesi N., Wright J. J. K. *et al.*, (1991). Lowering of Serum Cholesterol in Hypercholesterolemia Human by Tocotrienol, *Jour. Am. Clin. Nutr.*, **53**: 1021S-1026S.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., (1988). A Simple Technique for Quantitation

Wan Zurinah Wan Ngah, Noor Aini Abdul Hamid, Azian Abdul Latiff, Zaiton Zakaria, Musalmah Mazlan, Johari Ibahim, Chin Siok Fong, Aminuddin Abdul Karim

of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells, *Exp. Cell Biol.*, **175**: 184-191.

Differentiation and Ageing: A Unified Theory, *Basic Life Science*, **35**: 75-104.

Sohal R.S. & Allen R.G., (1985). Relationship between Metabolism Rate, Free Radicals,

LAMPIRAN

Table 1: Numbers of subjects according to age

Group	Age	n
Placebo	30-39	2
	40-49	10
	50-59	2
	>60	-
Vitamin E Supplementation	30-39	1
	40-49	6
	50-59	3
	>60	-
Total		24

Table 2: Lipid profile between placebo group and vitamin E group at 0, 3 and 6 months supplementation.

Parameters	Placebo			Vitamin E		
	0 month	3 months	6 months	0 month	3 months	6 months
Total Cholesterol	5.24±0.59	4.88±0.86	5.29±0.45	5.59±0.59	5.62±0.74	5.60±0.72
Triglyceride	0.98±0.53	1.14±0.30	0.99±0.34	1.08±0.50	1.09±0.61	1.3±0.48
LDL	3.44±0.43	3.06±0.29	3.21±0.34	3.7±0.63	3.68±0.75	3.5±0.83
HDL	1.48±0.27	1.32±0.37	1.64±0.38	1.39±0.22	1.43±0.28	1.51±0.28 *

* There is significant increased ($p < 0.05$) in HDL level and HDL/Total cholesterol ratio after 6 months supplementation compared to 0 month.

Table 3: Liver function test between placebo group and vitamin E group at 0, 3 and 6 months supplementation. * There is significant difference ($p < 0.05$) in ALT levels after 3 and 6 months supplementation compared to 0 month.

Parameters	Placebo			Vitamin E		
	0 month	3 months	6 months	0 month	3 months	6 months
Protein	80.69±3.25	77.91±5.11	78.09±4.06	77.13±5.78	80.13±4.81	78.21±3.60
Albumin	40.07±3.42	39.9±3.65	39.5±1.27	39.53±2.47	41.06±2.25	40.07±3.32
Bilirubin	12.62±6.82	11.29±7.06	11.81±10.19	11.47±3.77	12.06±4.28	10.93±3.79
ALP	59.9±10.95	64±13.07	62±17.83	61.47±8.17	66.07±16.23	62.13±14.4
ALT	19.31±12.28	19.64±9.06	23.55±8.44	26.6±7.98	17.73±6.54*	18.57±6.33*
Calcium	2.41±0.10	2.39±0.12	2.44±0.17	2.42±0.06	2.40±0.10	2.42±0.12

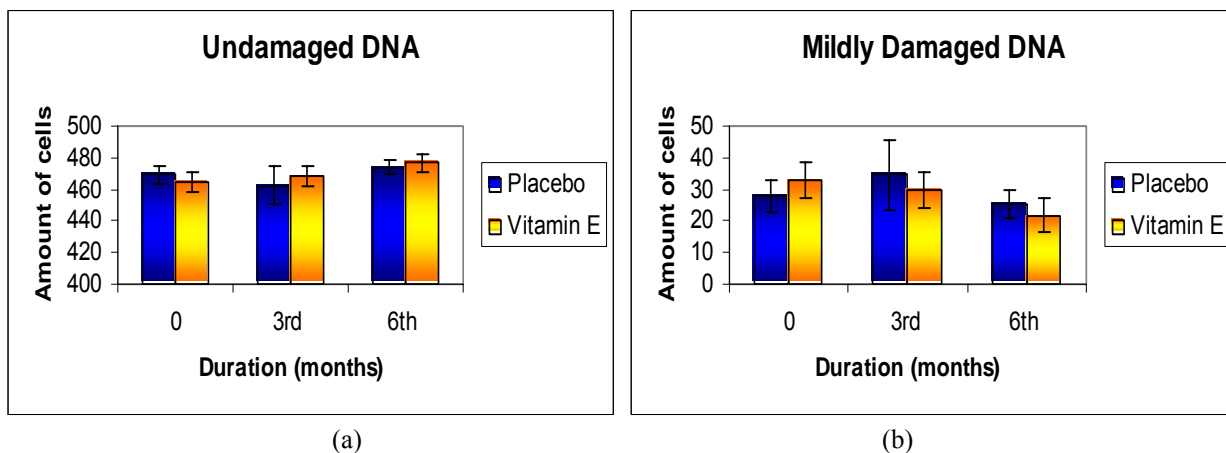


Figure 1: (a) Effect of Vitamin E supplementation on undamaged DNA level. (b) Effect of Vitamin E supplementation on mildly damaged DNA level. Results are means \pm SEM. Values statistically different from 0 month (t-test, 95% confidence level) are indicated with an asterisk

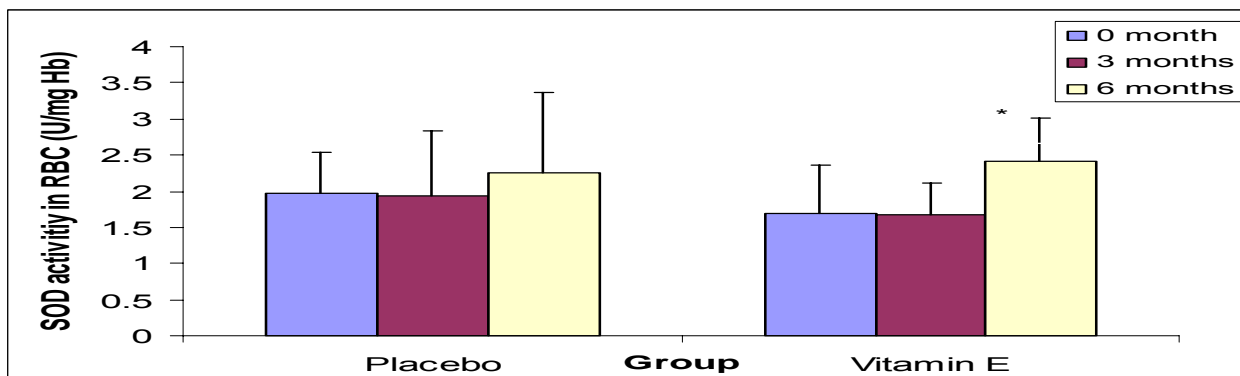


Figure 2: SOD activity between placebo group and vitamin E group at 0, 3 and 6 months supplementation.

* There is significant increase ($p < 0.05$) in SOD activity after 6 months supplementation compared to 0 month. Figure 2 shows significant increase ($p < 0.05$) for SOD activity in the vitamin E supplementation group after six months of supplementation given to them

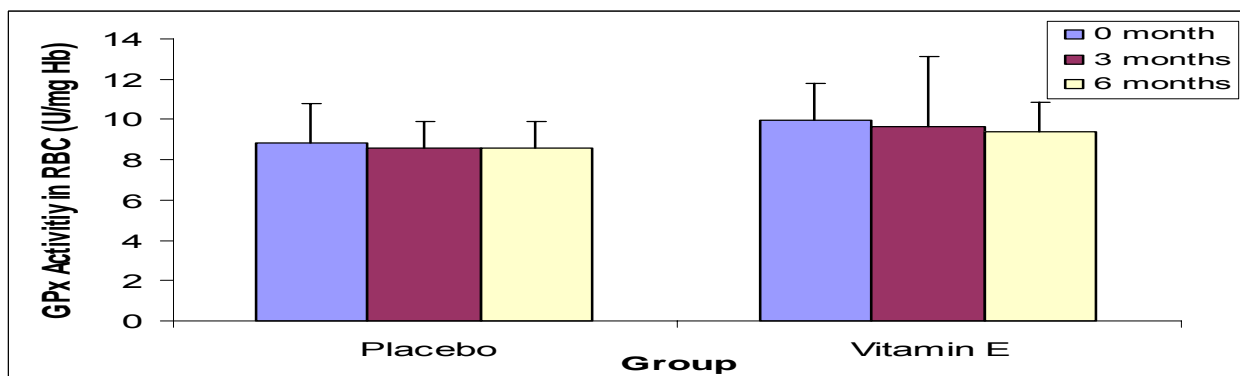


Figure 3: GPx activity between placebo group and vitamin E group at 0, 3 and 6 months supplementation

Formulation OF EFFICIENT NPK Multi Fertilizer FOR VEGETABLE plants Based on Their Elements Migration: adsorbed into plant, deposited in soil and lost to Environment

Wawang Suratno¹, Intan Asri¹, Dini Faradila¹

1) Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padjadjaran University, Bandung. E-Mail: wawang@bdg.centrin.net.id

Abstract

The usage of fertilizer for vegetable plants is very large and covers wide regions at the present. In the fact however, NPK multi fertilizer still not yet efficient and generate environmental pollution. The aims of this research are prepare the formula of efficient NPK multi fertilizers for vegetable plants (potato = Solanum tuberosum and tomato = Lycopersion lycopersicum) with minimum levels of pollution. This research was conducted at a greenhouse and laboratory scale with 13 combinations of NPK in multi fertilizers during growing plant period to their elements migration: adsorbed into the plants, deposited in the soil and lost to environment. The experiments were carried out into three times replications. The contain of nitrogen, phosphor, and potassium were analyzed by using the integrated Kjeldahl-Nessler method, the Olsen method and the flame photometry method, respectively.

The results revealed that all of the multi fertilizer formulas into tomato and potato plants were not efficient due to the percentage of nutrients (N, P, and K) were adsorbed by plants were low, whereas the percentage of nutrients lost to environment are higher. Distribution of nitrogen (adsorbed by the plant, deposited in the soil, and lost to environment), in tomato and potato plants for each fertilizer formula was not different significantly at 95% confidence level. Distribution of phosphor in tomato plant for each fertilizer formula was not different significantly, whereas the distribution in potato plants was different significantly. The highest adsorbed phosphor in potato plants showed in the sample 1 with NPK formula are 8:6:6. Whereas the lowest phosphor lost to environment showed in the sample 13 with NPK formula 8:8:4. Distribution of potassium in tomato plants for each fertilizer formula was not different significantly, whereas the distribution in potato plants was different significantly. The most adsorbed potassium in the potato plant with NPK formula 8:6:4, while the least potassium migration to environment was sample 8 that had NPK's formula 10:8:2.

Key words: NPK fertilizer, Vegetable plants, Migration

I. Introduction

Fertilization represents one of the important efforts to increase agriculture product. NPK multi fertilizers for vegetable plants have been in market with different grade fertilizer, for example the Rustika Yellow contained NPK 15:10:12. the Phonska and the Pelangi contained NPK 15:15:15. So far vegetable farmer generally use the brand fertilizer representing mixture from single of nitrogen, phosphorus and potassium compounds. (Soelarso, 1997).

Basically, land usage continually can effect deficiencies of the macro and micro nutrients, which required by the plants. One of the way to solve the macro and micro nutrients insufficiency by giving synthezed fertilizer in agriculture farm.

Increasing the usage of inorganic and organic fertilizers from year to year resulted not only to agriculture product but also environment impact due to very big fertilizer lost to environment which can potency to endanger the ecology balance. One of the ecology

endangers is eutrofication of waters body.

The farmers tend to give fertilizer with the excessive concentration, on the chance of the fertilizer will be more absorbed by the plants so that their production will be more gratify. Even though in reality, giving excessive fertilizer will influence the plants. On the other hand, inefficient fertilizer means damaging the economic agriculture system, because expense released by farmer bigger than fertilizer value exploited by plant.

There are some ways of fertilizer inefficient in agriculture farm. The nitrogen fertilizer in soil change to ammonium or nitrate ions, that is easy brought by water. Even the alterable denitrification process nitrate becomes to N_2O and N_2 gases, able to go out into the air (Suratno, 1997). Phosphor fertilizer is generally in polyphosphate form, which in soil can be condensed and precipitated, for example as calcium phosphate. While the potassium fertilizer which generally salt of potassium chloride and potassium oxide are very easy dissolve in water, so that earn the castaway through the surface or ground water (Sutejo, 1999).

Lembang and Bandung South (Ciwidey and Pangalengan) areas are representing the centre area of vegetable plantation. The dominant vegetable plants in that area are tomato and potato plants, and other vegetable plants such

as cabbage, chili etc. Therefore, the inefficient fertilizer and minimalization the environmental pollution in the area of the vegetable plants centre conducted this research.

The research objectives are to find formula of efficient NPK multi fertilizers for potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersion lycopersicum*) based on their elements migration i.e. adsorbed into plant, deposited in soil and lost to environment. The NPK multi fertilizer be expected have low level pollution to environment. This research is also try to find NPK multi fertilizer that has low level of environmental pollution. This preliminary research carried out in laboratory and greenhouse scale and can be developed to field research.

2. Experimental

Materials used in this research are soil from farm of agriculture Lembang, tomato seed (*Lycopersion lycopersicum*) varietas martha, potato seed (*Solanum tuberosum*) and the NPK multi fertilizer formulating from the ZA (*zwavelzuure amoniak* = ammonium sulphate), the SP 36 (super phosphate of 36% P_2O_5) and the KCl fertilizers. Chemicals to analyzed are the N, P, K contents used by common procedure which effected by ascorbic acid, concentrated sulphuric acid, 25% of hydrochloride acid, mixture of selen and 30% of sodium hydroxide, Nessler solution, Olsen pereaction, ammonium standard, phosphate

Table 1. The Formula of NPK multi fertilizer for tomato and potato plants.

No	Formula of N:P:K* Tomato Plant	Formula of N:P:K* Potato Plant
1	3 : 2 : 2.5	8 : 6 : 6
2	3 : 2.5 : 2	8 : 7 : 5
3	3 : 3.5 : 1	8 : 9 : 3
4	3 : 4 : 0.5	8 : 10 : 2
5	2 : 3 : 2.5	6 : 8 : 6
6	2.5 : 3 : 2	7 : 8 : 5
7	3.5 : 3 : 1	9 : 8 : 3
8	4 : 3 : 0.5	10 : 8 : 2
9	2 : 4 : 1.5	6 : 10 : 4
10	2.5 : 3.5 : 1.5	7 : 9 : 4
11	3.5 : 2.5 : 1.5	9 : 7 : 4
12	4 : 2 : 1.5	10 : 6 : 4
13**	3 : 3 : 1.5	8 : 8 : 4
N	3 : 0 : 0	8 : 0 : 0
P	0 : 3 : 0	0 : 8 : 0
K	0 : 0 : 1.5	0 : 0 : 4

Note: *Nitrogen from ZA fertilizer; phosphor as P_2O_5 from SP36 fertilizer and potassium as K_2O from KCl fertilizer. Unit is in gram.

**Standard formula based on result of the research by Hall of Vegetable Plant Research, Lembang, West Java and ordinary practiced by vegetable farmer.

solution standard and potassium solution standard.

Formula of early multi fertilizer for the tomato and the potato plant based on the results of Hall of Vegetable Plant Research, Lembang, West Java and ordinary practiced by vegetable farmer. Fertilizer for the tomato plant was used mixing of the ZA, SP36 and KCL of 100, 100 and 50 kg/ha, respectively for the distance between plants was 50X60 cm, that mean the formula of the N:P:K was 3:3:1.5 g/plant. Fertilizer for the potato plantation was used mixing of the ZA, SP36 and KCL of each 400, 400 and 200 kg/ha, respectively for when the distance between plant was 70X30 cm, that mean the formula of the N:P:K was 8:8:4 g/plant. And then it made variation of formula fertilizer by one of the fertilizer elements made remain to like early dose, two others are increased two level upward and are decreased two level downwards. Thereby the each plant have 13 variations of multi fertilizer formulas, added by a plant which was only using single fertilizer of nitrogen, phosphor and potassium, so that total variation were 16 formula by 3 times replicating. To be more visible look at Tables 1.

Cultivation was done in polybag filled by 7 kg andosol soil from Lembang, fertilizer dispersed in the middle of soil, and seed placed in the middle of polybag. Plant care covers the sprinkler, mowing and pesticide spraying. Sampling of potato plant was done on the 65th day of plantation together soil sampling and sampling of tomato plant was done on the 100th day of plantation together soil sampling.

The nitrogen content in the sample analyzed with the Kjeldahl method integrated with the Nessler method, the phosphorus analyzed with the Olsen method, and the potassium analyzed with the flame photometry method. Analyze of the elements N, P and K did either from soil or from plant or seed before fertilization and after harvest.

Nitrogen, phosphor and potassium contents at tomato and potato plantations for each fertilizers formula saw from response of deposited in soil, adsorbed by plant and lost to environment, thought statistically significance test with the Test Wilks at 95% confidence level.

3. Results and Discussion

3.1. Migration of nitrogen of multi fertilizer at tomato and potato plantations

Experiment results of tomato and potato plantations showed that the distribution of nitrogen migration i.e. deposited in soil, adsorbed in plant and lost to environment as like in the Figure 1 or in Appendix Table 1 and in Appendix Table 2.

Pursuant to Figure 1 or data at Appendix Tables 1 and Appendix Tables 2, seen that mean percentage of absorbed nitrogen for all fertilizer formulation of tomato plantation just around 0.40%. If it evaluated from giving nitrogen fertilizer, this percentage was relative very small. While for the potato plantation of nitrogen mean adsorbed was around 30.48%, it was relative higher than tomato plantation.

There are some factors causing tomato plant become less nitrogen adsorption, among others from properties of fertilizer. The ZA fertilizer dissolves easy in water, and can deposited in soil colloid. Nitrogen absorption was on related to the plant ability, which determined by for example type of nitrogen component as result of decomposing of ZA fertilizer in soil. Initially ZA decomposed to the ammonium, then through the nitrification process in anaerobic condition will become the nitrate. If tardy nitrification happened because one other reason, hence difficult ammonium adsorption by root of tomato plant, as a result element only a few take by the plant. If pH of soil a few above neutral hence possibility will be happened the emulation between OH⁻ and NO₃⁻ ions, so that nitrate absorption pursued. While in potato plantation to form its corm is required relative the more nitrogen. Potato plant adsorbs the nitrogen element in the form of ammonium and also nitrate, so that since early nitrogen fertilization have earned adsorbed by potato root.

At Figure 1 also can be seen that sample 9 (formula NPK = 2:4:1.5) in group of tomato plantation, owning adsorbed nitrogen was the biggest (0.56%). While in group of potato plantation sample no 11 (formula NPK = 9:7:4) show the biggest nitrogen absorption (31.12%). The mentioned indicate that the formula was most efficient for the each plant.

The data of deposited nitrogen in soil generally show that the level were relative high for every

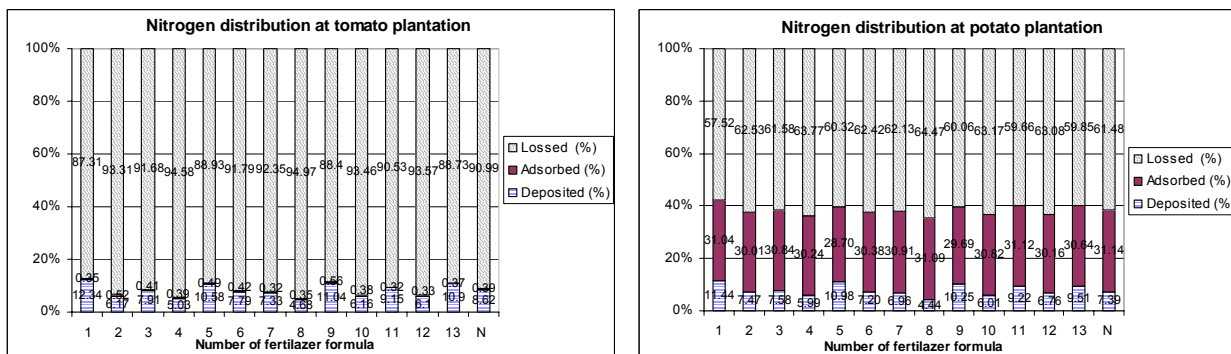


Figure 1. Distribution of nitrogen migration in tomato and potato plantations

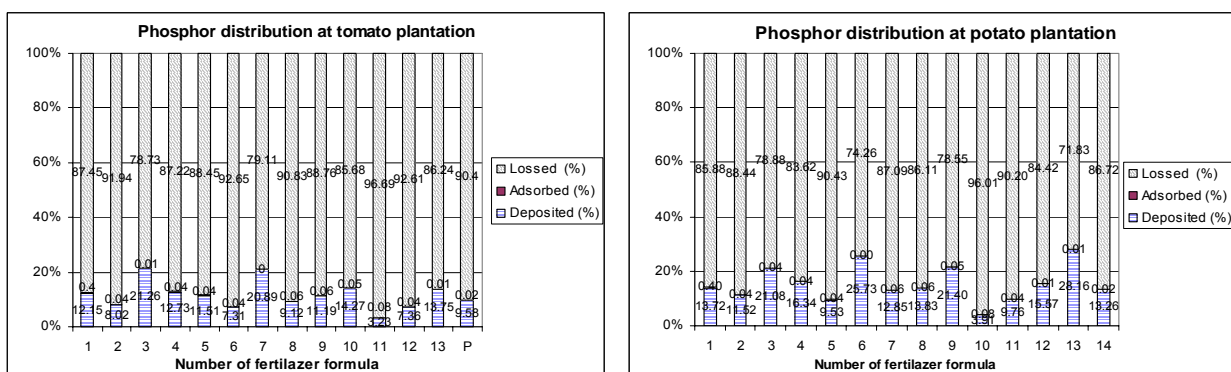


Figure 2. Distribution of phosphor migration in tomato and potato plantations

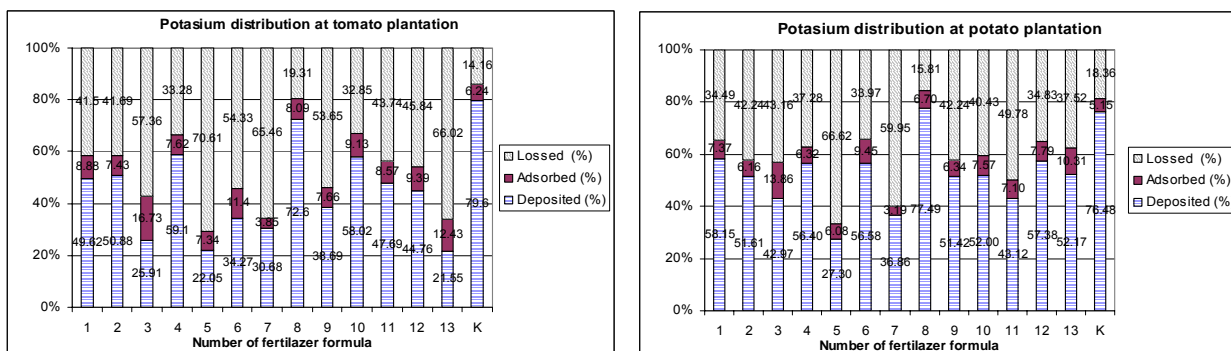


Figure 3. Distribution of potassium migration in tomato and potato plantations

fertilizer formula. From data of experiment result revealed that mean nitrogen percentage in soil to entire formula at tomato and potato plantations were 9.66% and 7.94% respectively. For the tomato plantation this value was higher than adsorbed nitrogen by plant, so that could be calculated less amount of the nitrogen fertilizer at next plantation season. The value for the potato plantation was under plant requirement of adsorbed nitrogen, so that at next plantation season the potato plant still require the nitrogen fertilizer.

Figure 1 show indicating that loosing of nitrogen fertilizer to environment was very

higher than absorbed by plant. Mean value of lost nitrogen for the tomato and potato plantations were 91.47% and 58.58% respectively. This nitrogen loss due to some factor, among others that is washes out. The properties of ZA fertilizer is dissolve easy in water, so that is easy to clean by percolation or sprinkler water. Besides, nitrogen in soil can release to air through the denitrification process in anaerobe soil layer. This process altered the available nitrate for plant became the free nitrogen gas into the air.

The sample 9 (formula NPK = 2:4:1.5) at tomato plantation was the least nitrogen lost to

environment equal to 88.40%, while at potato plantation the sample 1 (formula NPK = 8:6:6) equal to 55.07% was the least nitrogen loss. Presumably next research to come cared reduction of environment pollution coming from vegetable plantation field, hence require to be made multi fertilizer with nitrogen percentage not equal to single fertilizer as farmer standard and require to strive the NPK multi fertilizer formula, which have slow release property with membrane coating.

3.2 Migration of phosphor of multi fertilizer in tomato and potato plantations

Experiment results of tomato and potato plantations showed that the distribution of phosphor migration i.e. deposited in soil, adsorbed in plant and lost to environment as like in the Figure 2 or in Appendix Table 1 and in Appendix Table 2.

Pursuant to the figure and the data, seen that phosphorus element adsorbed by tomato and potato plantation were very small with mean percentage of each of 0.06%. Mostly phosphor loose to environment and some others deposited in soil. Whether tomato plantation and also potato plantation, both showing sample 1 (formula NPK = 3:2:2.5 for tomato and formula NPK = 8:6:6 for potato) had the highest percentage (0.40%) of adsorbed phosphorus, compared to [by] other sample. It can say that these fertilizer formulas were the most efficient in the case of absorption of phosphate.

Absorbed phosphorus by plant is in the form of inorganic ion will quickly turn into the organic phosphorus compound. This organic phosphorus easy move between plant tissues. This matter causing absorbed phosphor relative small when compared to adsorbed nitrogen by plant. Besides than that if the SP 36 fertilizer mixed with the ZA fertilizer it can ossify so that difficult plant roots to adsorb.

Result of calculation generally shows that the mean percentage of deposited phosphor in soil was 11.60% for the tomato plantation and was 15.48% for the potato plantation. This matter is computable for next plantation season phosphor fertilizer can be reduced because in soil is still enough available phosphor. The biggest of deposited phosphor at tomato plantation was on sample 3 (formula NPK=3:3.5:1) was equal to 21.26%, while at potato plantation was on

sample 6 (formula NPK=7:8:5), was equal to 25.73%.

Pursuant to this research data, could be knowable that the smallest of lost phosphor at the tomato plantation was in sample 3 (formula NPK= 3:3.5:1) equal to 78.73%, while at the potato plantation was 1n sample 13 (formula standard NPK= 8:8:4), equal to 71.83%. Mean percentage of the lost Phosphor was higher than deposited phosphor in soil and adsorbed by plant. This is opposite to Marschner (1986), which said generally phosphor fertilizer difficult to clean by rainwater and irrigate or sprinkler water so that phosphor loosing is expected relative small. This matter should be detailed investigated.

3.3 Migration of potassium of multi fertilizer in tomato and potato plantations

Experiment results of tomato and potato plantations showed that the distribution of potassium migration i.e. deposited in soil, adsorbed in plant and lost to environment as like in the Figure 3 or in Appendix Table 1 and in Appendix Table 2.

This research data show that mean percentage of adsorbed potassium in tomato plant was 6.24% and in potato plant was 5.15%. The highest percentage of adsorbed potassium at tomato plantation was in sample 3 (formula NPK= 3:3.5:1) equal to 16.73% and at potato plantation was also in sample 3 (formula NPK= 8:9:3) equal to 13.86%. The fertilizer formulas were most efficient to each for the plant of tomato and of potato.

Absorbed potassium by plant root is in the form of K^+ , which its function is to accelerate forming of carbohydrate by photosynthesis, strengthening plant protection to attack of disease pest and improve the seed. Lacking of potassium in a plant will cause plant stalk weak so that easy plant fall down.

The experiment data also show that at tomato plantation the mean percentage of deposited potassium in soil was equal to 45.39%, while at potato plantation was equal to 52.85%. These values were higher than deposited nitrogen and than deposited phosphor. This matter due to andosol soil type from Lembang which contain high enough potassium concentration.

Available potassium in soil is changeable in colloidal soil with other element. Therefore

Wawang Suratno, Intan Asri, Dini Faradila

potassium in soil would be more easy adsorbed by plant roots but also easier lose effect of wash.

Pursuant to Figure 3 showed that at tomato plantation the mean percentage of lost potassium to environment much close the mean

Multivariate Tests of Significance (tomat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.000000	2099812	3	26.0000	0.00000
formula	Wilks	0.22055	1	39	77.7394	0.14409

Multivariate Tests of Significance (kentangn) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.023668	556.8889	2	27	0.000000
formula	Wilks	0.789815	0.2601	26	54	0.999804

Multivariate Tests of Significance (tomatp) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.424684	18.28834	2	27	0.000010
formula	Wilks	0.598126	0.60857	26	54	0.915449

Multivariate Tests of Significance (kentangp) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.036711	354.2386	2	27	0.000000
formula	Wilks	0.034066	9.1759	26	54	0.000000

Multivariate Tests of Significance (tomat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.133847	87.36155	2	27	0.000000
formula	Wilks	0.465159	0.96830	26	54	0.521955

Multivariate Tests of Significance (kentangK) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.029090	450.5779	2	27	0.000000
formula	Wilks	0.243128	2.1352	26	54	0.009438

Statistical Analysis

percentage of deposited potassium i.e. around 45.40 - 45.70%. While at the potato plantation the mean lost potassium was only 39.76%, that smaller than deposited in soil. Figure 3 also show that at tomato plantation the smallest of lost potassium is in sample 8 (formula NPK=4:3:0.5) equal to 19.31%, also at potato plantation the smallest is in sample 8 (formula NPK= 10:8:2) equal to 15.81%. When potassium from agriculture field lost small hence can depress the water pollution by potassium. According to Rosmarkam and Yuwono (2002), more ammonium given, hence more to decrease the potassium discharged. In addition, soil acidity have an effect on to potassium fixation, where nutrient of potassium is easy to adsorb in pH around 5.5 – 9.0.

In sound of soil fertility, balance of potassium with other element is important to be paid attention because nature of physiological plant often needs the proportional potassium with the other element. Imbalances between potassium with other element cause the deficiencies symptom of the one of the elements.

3.4 Statistical Analysis

Nitrogen at tomato and potato plantations

Nitrogen distributions at tomato and potato plantations for each fertilizers formula seen from response of deposited in soil, adsorbed by plant and lost to environment were not statistically significance with the Test Wilks at 95% confidence level or $p = 0.05$.

Phosphor at tomato and potato plantations

Phosphor contents at tomato plantations for each fertilizers formula seen from response of deposited in soil, adsorbed by plant and lost to environment were not statistically significance with the Test Wilks at 95% confidence level.

But phosphor distribution at potato plantations were statistically significance with the same test

Potassium at tomato and potato plantations

Potassium distribution at tomato plantations for each fertilizers formula seen from response of deposited in soil, adsorbed by plant and lost to environment were not statistically significance with the Test Wilks at 95% confidence level.

But potassium contents at potato plantations were statistically significance with the same test

4. Conclusion

Research result revealed that above discussion went to below conclusions:

- All of multi fertilizer formulas at tomato and potato plantations were not efficient, because amount of nutrients (N, P and K) were little adsorbed, whereas lost nutrients to environment too much.
- Nitrogen distributions at tomato and potato plantations for each fertilizer formula were not different significantly at 95% confidence level.
- Phosphor distribution at tomato plantation for each fertilizer formula was not different significantly at 5% confidence, but the distribution at potato plantation for each fertilizer formula was different significantly. The highest adsorbed phosphor at potato plantation was in the sample 1 that had NPK formula 8:6:6. Whereas the lowest lost phosphor to environment was in the sample 13 that had NPK formula 8:8:4.
- Potassium distribution at tomato plantation for each fertilizer formula was not different significantly at 5% confidence, but potassium distribution at potato plantation for each fertilizer formula was different significantly. The highest adsorbed potassium at potato plantation was in the sample 13 that had NPK formula 8:6:4. Whereas the lowest lost potassium to environment was in the sample 8 that had NPK formula 10:8:2.

Suggestion

This research was difficult to be made a hypothesizing because experiment subject is life so that it's free variable plenty. The analysis mistakes should be decreased by comparing with other analysis method and increasing multiplication of experiment.

To know how much concentration of nutrients which migration into plant, soil and environment with the high validity, needed furthermore research especially to know the environmental factor influence to migration rate of nutrients. For example soil type, geographical height, rainfall and activity of microorganism in the ecosystem.

In the effort to developed Indonesia agriculture, where in this case especially to all vegetable farmer, needed a productivity test to the formula of the efficient NPK multi fertilizer which proposed to its result can be implemented.

5. Acknowledgment

Writers say many thank and appreciate to QUE Project of Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padjadjaran University which is on year 2004 have defrayed this research as project grant.

6. References

Anonymous.2003. *Soil Layers*.
<http://www.enchantedlearning.com/geology/label/soillayers>

Bloomfield, C., Coulter J.K., 1973. *Genesis and Management of Acid Sulphate Soils*. Harpenden: Rothhamstead Experimental Station.

Brady, N.C., and Weil R.R., 1996. *The nature and the properties of soil*. Prentice Hall.

Epstein, E., 1972. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. New York: John Wiley and Sons.

Fitzpatrick, E. A., 1994. *An Introduction to Soil Science*. Second edition. Singapore: Longman Singapore Pub. Pte. Ltd.

Gardner, F. P., Pearce R.B., Mitchell R.L., 1985. *Physiology of Crop Plants*. Iowa: Iowa State University Press.

Manahan, S.E., 2000. *Environmental Chemistry*. London: Lewis Pub. Co.

Marschner, H. 1986. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press Harcourt Brace Jovanovich.

Rosmarkam, A., Yuwono N.W., 2002. *Ilmu Kesuburan Tanah*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Rubatzky, V.E., Yamaguchi M., 1998. *Sayuran Dunia*. Edisi ke dua. Penerjemah Ir. Catur Herison, MSc. Bandung: Penerbit ITB

Soelarso, R.B., 1997. *Budi Daya Kentang Bebas Penyakit*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Suratno, W., 1997. *Fluks Nitrous Oksida (N₂O) di Tanah Sawah: Pengaruh Teknik Irigasi, Pupuk Urea dan Varietas Padi*. Desertasi, Program Pascasarjana IPB. Bogor.

Suratno, W., Murdiyarsa, D., Suratno, F.G., Anas, I., Saeni, M.S., and Rambe, A. 1998. Nitrous Oxide Flux from Irrigated Rice Fields in West Java. *Environmental Pollution* 102, S1 (1998) 159-166.

Sutejo, M.M., Kartasapoetra A.G., 1991. *Pengantar Ilmu Tanah*. Cetakan ke dua. Jakarta: PT Rineka Cipta.

Sutejo, M.M., 2002. *Pupuk dan Cara Pemupukan*. Cetakan ke tujuh. Jakarta: PT Rineka Cipta.

Thompson, L.M., Troeh F.R., 1978. *Soil and Soil Fertility*. New York: McGraw-Hill Book. Co.

Tisdale, S.L., Nelson W.L., Beaton J.D., 1985. *Soil Fertility and Fertilizer*. New York: MacMillan Pub. Co.

Wawang Suratno, Intan Asri, Dini Faradila

APENDIX TABEL 2
POTATO PLANTATION
Nitrogen

No. sampel	Formula NPK Fertilizer	% Deposited in soil				% adsorbed by plant				% losted to environment			
		1	2	3	Mean	1	2	3	Mean	1	2	3	Mean
1	8:6:6	15.25	5.10	13.98	11.44	29.57	30.08	33.47	31.04	55.18	64.82	52.56	57.52
2	8:7:5	3.58	2.89	15.93	7.47	23.45	27.78	38.79	30.01	72.97	69.33	45.28	62.53
3	8:9:3	6.91	4.50	11.33	7.58	38.40	28.58	25.54	30.84	54.69	66.92	63.13	61.58
4	8:10:2	5.02	7.99	4.97	5.99	34.78	32.20	23.74	30.24	60.20	59.81	71.29	63.77
5	6:8:6	6.77	7.39	18.77	10.98	29.79	34.22	22.10	28.70	63.44	58.39	59.13	60.32
6	7:8:5	6.33	6.43	8.83	7.20	37.21	28.45	25.49	30.38	56.46	65.12	65.69	62.42
7	9:8:3	5.57	4.97	10.34	6.96	28.43	25.76	38.54	30.91	66.00	69.27	51.13	62.13
8	10:8:2	9.25	5.52	-1.46	4.44	30.25	33.66	29.37	31.09	60.50	60.82	72.08	64.47
9	6:10:4	6.84	5.90	18.00	10.25	28.68	30.51	29.88	29.69	64.48	63.59	52.12	60.06
10	7:9:4	6.69	4.05	7.30	6.01	40.12	28.47	23.87	30.82	53.19	67.48	68.83	63.17
11	9:7:4	4.41	3.44	19.81	9.22	23.55	26.98	42.84	31.12	72.04	69.58	37.36	59.66
12	10:6:4	5.73	3.01	11.54	6.76	29.92	32.74	27.83	30.16	64.35	64.25	60.64	63.08
13	8:8:4	8.43	5.29	14.81	9.51	33.88	29.44	28.60	30.64	57.69	65.27	56.59	59.85
N	8:0:0	5.31	4.27	12.58	7.39	35.04	28.58	29.79	31.14	59.65	67.15	57.63	61.48

Phosphor

No. sampel	Formula NPK Fertilizer	% Deposited in soil				% adsorbed by plant				% losted to environment			
		1	2	3	Mean	1	2	3	Mean	1	2	3	Mean
1	8:6:6	17.46	10.58	13.12	13.72	0.61	0.21	0.39	0.40	81.93	89.21	86.49	85.88
2	8:7:5	16.54	8.33	9.70	11.52	0.04	0.04	0.04	0.04	83.42	91.63	90.26	88.44
3	8:9:3	18.22	22.26	22.75	21.08	0.06	0.02	0.04	0.04	81.72	77.72	77.21	78.88
4	8:10:2	13.27	18.53	17.23	16.34	0.09	0.01	0.02	0.04	86.64	81.46	82.75	83.62
5	6:8:6	10.04	8.04	10.52	9.53	0.08	0.02	0.02	0.04	89.88	91.94	89.46	90.43
6	7:8:5	18.75	26.37	32.08	25.73	0.01	0.01	0.01	0.01	81.24	73.62	67.91	74.26
7	9:8:3	15.92	9.50	13.14	12.85	0.09	0.06	0.03	0.06	83.99	90.44	86.83	87.09
8	10:8:2	13.48	11.08	16.94	13.83	0.08	0.04	0.06	0.06	86.44	88.88	83.01	86.11
9	6:10:4	19.56	26.41	18.22	21.40	0.04	0.07	0.04	0.05	80.40	73.52	81.74	78.55
10	7:9:4	6.47	4.12	1.15	3.91	0.11	0.07	0.06	0.08	93.42	95.81	98.79	96.01
11	9:7:4	8.88	10.47	9.94	9.76	0.03	0.04	0.05	0.04	91.09	89.49	90.01	90.20
12	10:6:4	13.35	17.86	15.49	15.57	0.02	0.01	0.01	0.01	86.64	82.13	84.50	84.42
13	8:8:4	26.67	29.14	28.66	28.16	0.01	0.02	0.00	0.01	73.32	70.84	71.34	71.83
P	8:0:0	14.73	19.28	5.77	13.26	0.04	0.01	0.01	0.02	85.23	80.71	94.22	86.72

Kalium

No. sampel	Formula NPK Fertilizer	% Deposited in soil				% adsorbed by plant				% losted to environment			
		1	2	3	Mean	1	2	3	Mean	1	2	3	Mean
1	8:6:6	44.38	39.95	90.11	58.15	12.76	4.80	4.54	7.37	42.86	55.25	5.35	34.49
2	8:7:5	48.48	60.43	45.91	51.61	6.31	5.36	6.80	6.16	45.21	34.21	47.28	42.24
3	8:9:3	52.74	45.62	30.56	42.97	11.66	7.35	22.58	13.86	35.60	47.03	46.86	43.16
4	8:10:2	66.77	40.76	61.67	56.40	8.56	6.59	3.80	6.32	24.67	52.65	34.53	37.28
5	6:8:6	30.84	35.48	15.58	27.30	6.11	5.48	6.65	6.08	63.05	59.04	77.77	66.62
6	7:8:5	60.71	33.94	75.10	56.58	8.92	4.62	14.81	9.45	30.37	61.44	10.10	33.97
7	9:8:3	38.22	32.22	40.13	36.86	4.54	3.54	1.49	3.19	57.24	64.24	58.38	59.95
8	10:8:2	75.72	79.36	77.40	77.49	8.48	9.58	2.04	6.70	15.81	11.06	20.56	15.81
9	6:10:4	48.90	55.09	50.27	51.42	9.73	5.55	3.75	6.34	41.37	39.37	45.98	42.24
10	7:9:4	60.05	38.80	57.16	52.00	11.27	5.64	5.80	7.57	28.68	55.56	37.03	40.43
11	9:7:4	41.15	52.18	36.03	43.12	7.75	7.84	5.72	7.10	51.10	39.99	58.25	49.78
12	10:6:4	48.85	59.33	63.97	57.38	9.97	9.80	3.59	7.79	41.18	30.87	32.45	34.83
13	8:8:4	55.86	60.28	40.37	52.17	11.88	6.77	12.28	10.31	32.26	32.95	47.35	37.52
K	0:8:0	70.80	60.06	98.58	76.48	6.27	5.68	3.51	5.15	22.93	34.26	-2.10	18.36

Cytotoxic Oligostilbenoids from two *Shorea* plants

Yana M. Syah¹⁾, Sjamsul A. Achmad¹⁾, Laily B Din²⁾, Emilio L. Ghisalberti³⁾,
Euis H. Hakim¹⁾, Lia D. Juliawaty¹⁾, Jalifah Latip²⁾ and Ikram M. Said²⁾

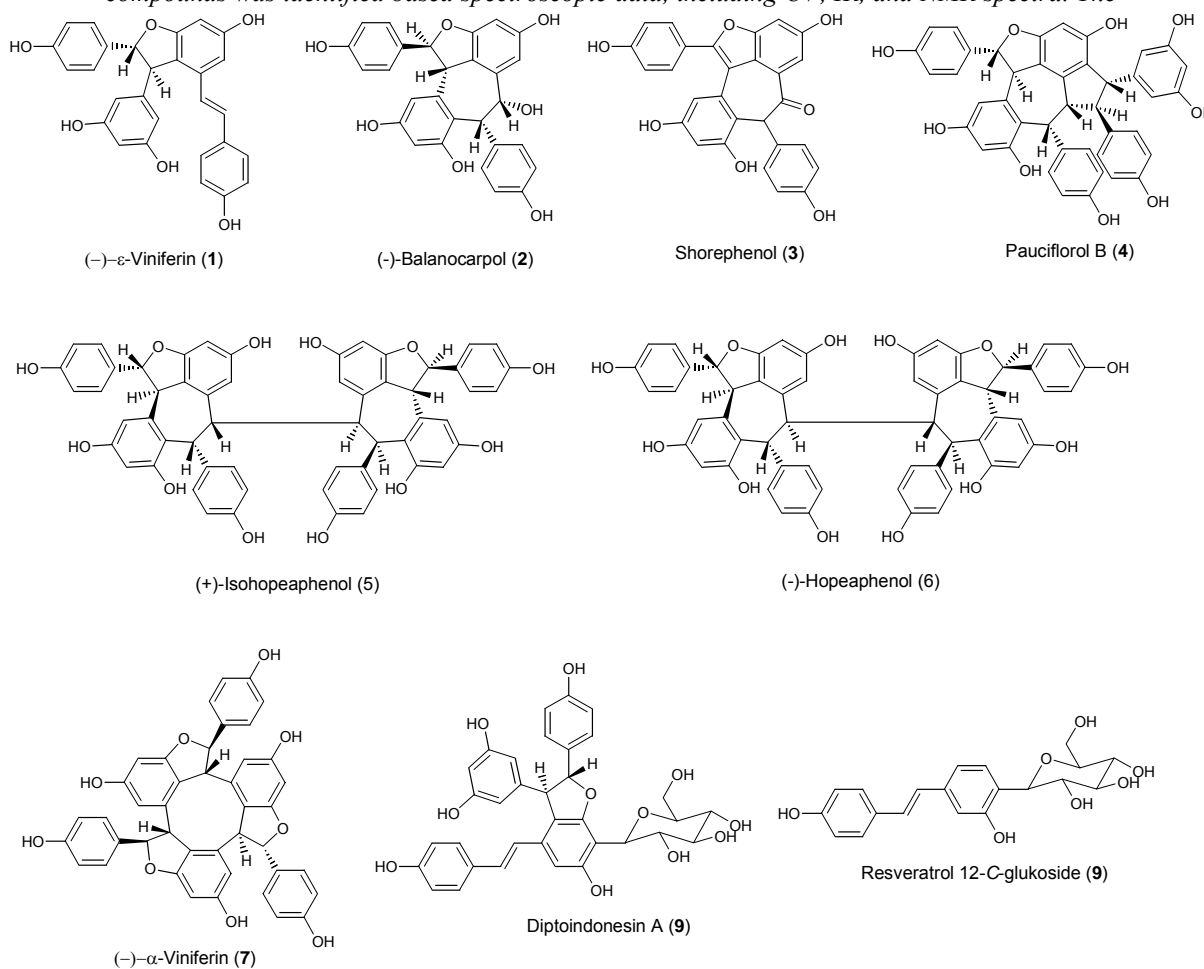
¹⁾ Department of Chemistry, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

²⁾ School of Chemistry and Food Technology, Faculty of Science and Technology, National University of Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

³⁾ Chemistry, School of Biomedical and Chemical Sciences, The University of Western Australia, Crawley, WA 6909, Australia

Abstract

Eight known oligostilbenoids, (-)- ϵ -viniferin (**1**), (+)-balanocarpol (**2**), shoreaphenol (**3**), pauciflorol B (**4**), (+)-isohopeaphenol (**5**), (-)-hopeaphenol (**6**), (-)- α -viniferin (**7**), and diptoindonesin A (**8**), and a resveratrol C-glucoside, resveratrol-12C-glucopyranoside (**9**), have been isolated from two *Shorea* plants, *S. javanica* and *S. ovalis*. The structure of these compounds was identified based spectroscopic data, including UV, IR, and NMR spectra. The



Pahmungan, Pesisir Tengah Krui, West Lampung, while the tree barks of *S. ovalis* were collected in May 2003 from the Experimental Botanical Garden of Haurbentes, Jasinga, Bogor. The identity of both plants was determined by the staff of Herbarium Bogoriense, Bogor, Indonesia. The plant specimens were deposited at the Herbarium Bandungense, Institut Teknologi Bandung, Indonesia.

Extraction and isolation

The dried powder of the root woods of *S. javanica* (1 kg) was macerated with MeOH (3 x 24 hours). The MeOH extract was evaporated in vacuo to yield a gummy solid (85 g). A part of the extract (20 g) was fractionated using liquid vacuum chromatography technique (silica gel 150 g) eluted with (each 150 ml) *n*-hexane-EtOAc of increasing polarity (1:1 2x, 2:3 4x, 3:7 4x, 1:4 2x), EtOAc (2x), and EtOAc-MeOH (9:1 2x) to give five major fractions A-E. Fractiob B (1.2 g) was purified with radial chromatography (silica gel) eluted with 15-17% MeOH in *n*-hexane-diisopropil eter (1:1) afforded ϵ -viniferin (20 mg) (**1**), and three fractions B2-B4 (each 55, 50, and 900 mg). Purification of fractions B2 and B3 using the same method gave shoreaphenol (10 mg) (**3**) and (+)-balanokarpol (30 mg) (**2**). A part of (1 g) of fraction D (3 g) was purified, also with radial chromatography eluted 17.5-20 % MeOH in diisopropil eter-*n*-heksana (1:1), to give pauciflorol B (115 mg) (**4**), and (+)-isohopeaphenol (80 mg) (**5**). Using the same methodology, purification of fraction E yielded (-)-hopeaphenol (5 mg) (**6**). Also, using the same methodology, from the MeOH extract of the tree barks of *S. ovalis* afforded α -viniterin (100 mg) (**7**), resveratrol-12C-glucopyranoside (10 mg) (**9**), and diptoindonesin A (15 mg) (**8**).

(-)- ϵ -Viniferin (1), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_D = -29,0$ (*c* 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 225 (sh), 321; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 208, 246 (sh), 243; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3338, 1605, 1513, 1448, 1337, 1242, 1171, 1122, 1002, 833; 1H NMR (MeOH-*d*₄) δ ppm: 7,14 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 7,03 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,82 (1H, *d*, *J* = 16,5 Hz), 6,76 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,65 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,63 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), 6,57 (1H, *d*, *J* = 16,5 Hz), 6,25 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), 6,18 (1H, *t*, *J* = 2,1 Hz), 6,16 (2H, *d*, *J* = 2,1 Hz), 5,36

(1H, *d*, *J* = 6,4 Hz), 4,35 (1H, *d*, *J* = 6,4 Hz); ^{13}C NMR (MeOH-*d*₄) δ ppm: 162,7 (C-11b), 160,0 (C-13a), 160,0 (C-11a), 159,7 (C-13b), 158,5 (C-4b), 158,4 (C-4a), 147,4 (C-9a), 136,9 (C-9b), 133,9 (C-1a), 131,1 (C-1b), 130,3 (C-8b), 128,7 (C-2b/6b), 128,2 (C-2a/6a), 123,7 (C-7b), 120,0 (C-10b), 116,3 (C-3b/5b), 116,2 (C-3a/5a), 107,5 (C-14a), 107,5 (C-10a), 104,4 (C-14b), 102,2 (C-12a), 96,9 (C-12b), 94,8 (C-7a), 58,3 (C-8a).

(+)-Balanocarpol (2), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_D = +49,0$ (*c* 0,1, MeOH); 1H NMR (MeOH-*d*₄) δ ppm: 7,45 (1H, *d*, *J* = 8,6 Hz), 7,03 (1H, *d*, *J* = 8,6 Hz), 7,03 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz), 6,81 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,58 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz), 6,52 (1H, *d*, *J* = 2,4 Hz), 6,34 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz), 6,32 (1H, *d*, *J* = 2,4 Hz), 5,48 (1H, *brs*), 5,29 (1H, *brs*).

Shoreaphenol (3), obtained as a bright yellowish solid; UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 224 (sh), 251 (sh), 293, 398; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 207, 247 (sh), 443; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3393, 1611, 1512, 1435, 1335, 1244, 1173, 1172, 1008, 836; 1H NMR (MeOH-*d*₄) δ ppm: 7,63 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz), 7,22 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz), 6,96 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz), 6,87 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz), 6,73 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz), 6,58 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz), 6,43 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz), 6,39 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz), 6,01 (1H, *brs*); ^{13}C NMR (MeOH-*d*₄) δ ppm: 199,2 (C-8b), 160,1 (C-4a), 159,0 (C-11a), 157,9 (C-13a), 156,5 (C-4b), 156,5 (C-13b), 155,4 (C-11b), 154,5 (C-7a), 135,6 (C-9b), 131,2 (C-2a/6a), 131,0 (C-1b), 128,7 (C-2b/6b), 123,4 (C-10b), 123,2 (C-1a), 116,7 (C-3a/6a), 116,2 (C-8a), 115,6 (C-3b/5b), 114,4 (C-10a), 112,1 (C-14b), 109,0 (C-14a), 103,0 (C-12b), 102,9 (C-12a), 56,5 (C-7b).

Pauciflorol B (4), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_D = -36,0$ (*c* 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} nm: 205, 229 (sh), 282; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 207, 250 (sh), 287; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3392, 1613, 1514, 1454, 1338, 1243, 1174, 1159, 1008, 833; 1H NMR (acetone-*d*₆) δ ppm: see Table 1; ^{13}C NMR (acetone-*d*₄) δ ppm: see Table 1; HMQC dan HMBC: see Table 1.

(+)-Isohopeaphenol (5), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_D = +190$ (*c* 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 229 (sh), 284; UV

(MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 207, 249 (sh), 289; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3401, 1614, 1510, 1452, 1358, 1241, 1172, 1153, 1134, 1085, 1006, 834; ^1H NMR (acetone- d_6) δ ppm: 8,71 (1H, *brs*), 8,18 (1H, *brs*), 8,01 (1H, *brs*), 7,82 (1H, *brs*), 7,75 (1H, *brs*), 7,54 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 7,00 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,40 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,39 (1H, *brs*), 6,34 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,31 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz), 5,85 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 5,66 (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz), 5,53 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 5,45 (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz), 5,17 (1H, *brs*), 3,46 (1H, *brs*); ^{13}C NMR (acetone- d_4) δ ppm: 160,5 (C-11b/11c), 158,6 (C-4a/4d), 158,5 (C-11a/11d), 158,2 (C-13b/13c), 156,8 (C-13a/13d), 155,2 (C-4b/4c), 141,7 (C-9b/9c), 140,8 (C-9a/9d), 137,5 (C-1b/1c), 133,8 (C-1a/1d), 130,8 (C-2a/6a/2d/6d), 129,9 (C-2b/6b/2c/6c), 118,3 (C-10a/10d), 117,0 (C-10b/10c), 116,6 (C-3a/5a/3d/5d), 114,7 (C-3b/5b/3c/5c), 109,7 (C-14b/14c), 107,1 (C-14a/14d), 102,5 (C-12a/12d), 95,2 (C-12b/12c), 93,6 (C-7a/7d), 53,8 (C-8a/8d), 52,8 (C-8b/8c), 43,6 (C-7b/7c).

(-)-*Hopeaphenol* (**6**), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_{\text{D}} = -401$ (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 226 (sh), 284; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 208, 249 (sh), 287; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3399, 1613, 1513, 1447, 1335, 1240, 1172, 1004, 833; ^1H NMR (acetone- d_6) δ ppm: 8,61 (1H, *brs*), 8,58 (1H, *brs*), 8,31 (1H, *brs*), 8,10 (1H, *brs*), 7,53 (1H, *brs*), 7,16 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,81 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,58 (1H, *d*, $J = 8,7$ Hz), 6,56 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 6,32 (1H, *brs*), 5,83 (1H, *brs*), 5,78 (1H, *d*, $J = 12,1$ Hz), 5,75 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 5,19 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 4,25 (1H, *d*, $J = 12,1$ Hz), 3,96 (1H, *brs*).

(+)- α -*Viniferin* (**7**), obtained as a dark-yellowish solid, $[\alpha]_{\text{D}} = -22,0$ (c 0,1, MeOH); UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 228 (sh), 285; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 207, 248 (sh), 294; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3380, 2920, 1614, 1515, 1435, 1361, 1232, 1170, 1113, 997, 832. The IR spectrum of compound **7** was identical with those standard (+)- α -viniferin.

Table 1. ^1H dan ^{13}C NMR data of pauciflorol B (4)

No	δ_{H} (multiplisitas, J dalam Hz)	δ_{C}	HMBC (H \Rightarrow C)
1a	-	130.8	-
2a/6a	7.25 (<i>d</i> , 8.6)	130.2	90.6, 130.2, 158.6
3a/5a	6.80 (<i>d</i> , 8.6)	116.1	116.1, 130.8, 158.6
4a	-	158.6	-
7a	5.83 (<i>d</i> , 11.7)	90.6	48.8, 130.2, 141.7
8a	4.46 (<i>d</i> , 11.7)	48.8	90.6, 116.0, 130.8, 141.7
9a	-	141.7	-
10a	-	124.8	-
11a	-	155.8	-
12a	6.35 (<i>brd</i> , 2.3)	101.7	105.9, 124.8, 156.8
13a	-	156.8	-
14a	6.16 (<i>brd</i> , 2.3)	105.9	48.8, 101.7, 124.8, 156.8
1b	-	133.3	-
2b/6b	7.18 (<i>d</i> , 8.6)	130.5	37.5, 130.5, 155.8
3b/5b	6.68 (<i>d</i> , 8.6)	115.5	115.5, 133.3, 155.8
4b	-	155.8	-
7b	5.27 (<i>d</i> , 3.4)	37.5	52.4, 124.8, 130.5, 133.3, 141.7, 144.1, 155.8
8b	3.65 (<i>dm</i> , 11.7)	52.1	62.0, 133.3
9b	-	144.1	-
10b	-	116.0	-
11b	-	159.5	-
12b	6.15 (<i>brd</i> , 0.8)	96.6	116.0, 121.1, 154.8, 159.5
13b	-	154.8	-
14b	-	121.1	-
1c	-	132.7	-
2c/6c	7.01 (<i>d</i> , 8.6)	130.0	62.0, 130.0, 156.8
3c/5c	6.73 (<i>d</i> , 8.6)	115.9	115.9, 132.7, 156.8
4c	-	156.8	-
7c	3.75 (<i>dd</i> , 11.7, 9.6)	62.0	52.4, 57.3, 130.0, 132.7, 146.8
8c	4.25 (<i>d</i> , 9.6)	57.3	62.0, 107.4, 121.1, 132.7, 146.8
9c	-	146.8	-
10c/14c	6.20 (<i>d</i> , 2.1)	107.4	57.3, 159.2
11c/13c	-	159.2	-
12c	6.18 (<i>t</i> , 2.1)	101.7	159.2
4a-OH	8.53 (<i>s</i>)		116.1, 158.6
11a-OH	8.31 (<i>s</i>)		124.8, 155.8
13a-OH	8.13 (<i>s</i>)		101.7, 105.9, 156.8
4b-OH	8.11 (<i>s</i>)		115.5, 155.8
13b-OH	6.75 (<i>s</i>)		96.6, 121.1, 154.8
4c-OH	8.17 (<i>s</i>)		115.9, 156.8
11c/13c-OH	8.06 (<i>s</i>)		159.2

Resveratrol 12C-glucopyranoside (8), obtained as a white solid, UV (MeOH) λ_{maks} nm: 205, 309; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 207, 341; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3401, 2925, 1620, 1607, 1512, 1444, 1383, 1238, 1031, 1013, 835; ^1H NMR (acetone- d_6) δ ppm: 7.41 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz), 7.02, 6.85 (1H, *d*, $J = 16.1$ Hz), 6.85 (1H, *d*, $J = 16.1$ Hz), 6.82 (2H, *d*, $J = 8.4$ Hz), 6.54

(1H, *s*), 4.93 (1H, *d*, $J = 9.5$ Hz), 3.70-3.45 (5H, *m*).

Diptoindonesin A (9), obtained as a yellowish solid; UV (MeOH) λ_{maks} nm: 203, 225 (sh), 321; UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm: 208, 246 (sh), 243; IR (KBr) ν_{maks} cm^{-1} : 3369, 2927, 1606, 1514, 1432, 1365, 1243, 1172, 1103, 1079, 1010, 835; ^1H NMR (acetone- d_6) δ ppm:

8,71 (1H, *s*), 8,67 (1H, *s*), 8,41 (2H, *s*), 8,09 (1H, *s*), 7,20 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz), 7,16 (2H, *d*, *J* = 8,6 Hz), 6,91 (1H, *d*, *J* = 16,5 Hz), 6,81 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz), 6,72 (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz), 6,69 (1H, *s*), 6,69 (1H, *d*, *J* = 16,5 Hz), 6,27 (2H, *d*, *J* = 2,2 Hz), 6,21 (1H, *t*, *J* = 2,2 Hz), 5,43 (1H, *d*, *J* = 5,8 Hz), 4,44 (1H, *d*, *J* = 5,8 Hz), 4,79 (1H, *d*, *J* = 9,7 Hz), 3,90-3,75 (3H, *m*), 3,65-3,40 (2H, *m*).

Cytotoxic assay

The cytotoxicity assay was conducted according to the method described by Alley *et al.* (1988). P-388 cells were seeded into 96 well plates at an initial cell density of approximately 3×10^4 cells cm^{-3} . After 24 hours incubation for cell attachment and growth, varying concentrations of samples were added. The compounds added were first dissolved in DMSO at the required concentration. Subsequent six desirable concentrations was prepared using PBS (phosphoric buffer solution, pH = 7.30-7.65). Control wells received only DMSO. The assay was terminated after 48 hours incubation period by adding MTT reagent and the incubation was continued for another 4 hours, in which the MTT-stop solution containing SDS was added and another 24 incubation was conducted. Optical density was read by using micro plate reader at 550 nm. IC_{50} value is taken from the plotted graph of percentage live cells compared to control (%), receiving only PBS and DMSO, versus tested concentration of compounds ($\mu\text{g ml}^{-1}$). The IC_{50} value is the concentration required for 50% growth inhibition. Each assays and analyses were run in triplicate and averaged.

3. Results and discussion

The dried powdered root woods of *Shorea javanica* were macerated in methanol to give a brown solid of methanol extract. Fractionation and purification of the extract using various chromatographic techniques yielded six oligostilbenoids compounds, *i.e.* (-)- ϵ -viniferin (**1**) (Oshima *et al.*, 1996), (+)-balanocarpol (**2**) (Tanaka *et al.*, 2000), shoreaphenol (**3**) (Saraswathy *et al.*, 1992), pauciflorol B (**4**) (Ito *et al.*, 2003), (+)-isohopeaphenol (**5**) (Zgodapols *et al.*, 2002), and (-)-hopeaphenol (**6**) (Ito *et al.*, 2000). Using the same methodology, from the MeOH extract of the tree barks of *S. ovalis* afforded (-)- α -viniterin (**7**) (Kinakata *et*

al., 1990), resveratrol-12C-glucopyranoside (**8**) (Ito *et al.*, 2000), and diptoindonesin A (**9**) (Aminah *et al.*, 2002). The structure of these compounds was determined based on the analysis of spectroscopic data, including UV, IR, and NMR spectra.

The cytotoxic properties of compounds **1-9** (Table 2) were determined against murine leukemia P-388 cells according to the method described previously (Alley *et al.*, 1988). Compounds **1-7** showed significant activity against P-388 cell lines, with hopeaphenol (**6**) and pauciflorol (**4**) being the most potent, while compounds **8** and **9** were inactive. Inspection of cytotoxicities of compounds **1-9** it appears that the degree of cytotoxic properties does not relate to the molecular size of oligostilbenoids. However, comparing the cytotoxic properties of compounds **8** and **9**, glucosylation of the oligostilbenoids abolishes cytotoxicities. Thus, polarity of the molecule gives significant contribution to the cytotoxic properties of oligostilbenoids against P-388 cells.

To our knowledge this is the first report of cytotoxic effects of the oligostilbenoids against P-388 cells. Several studies on the cytotoxic properties of oligostilbenoids against a number of human tumor cell lines have been described previously (Seo *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2003). These studies resulted that two tetramerstilbenoids, *i.e.* vatdiospyroidol (**10**) from *Vatica diospyroides* and vaticanol C (**11**) from *V. rassak*, were the most potent. Compound **11** was cytotoxic towards tumor cells KB, Col2 dan BC1, while compound **12** was active against tumor cells SW480, DLD-1, COLO201, PC3, LNCaP, SH-SY5Y, HL60, K562, and U937. Further studies on the cytotoxic effect of compound **11** showed that its cytotoxicity was due to the mechanism of apoptosis, possibly by affecting membrane proteins in the mitochondria.

Pauciflorol (**4**), the most active oligostilbenoids against P-388 cells in this study, belongs to the trimerstilbenoid class of compounds, members of which have been shown to exhibit antiinflammatory (Kitanaka *et al.*, 1990), antifungal (Bokei *et al.*, 1988), antibacterial (Gunawardena *et al.*, 1986; Sultanbawa *et al.*, 1987), ecdysteroid antagonist (Satyajit *et al.*, 1999), DNA topoisomerase II inhibitory (Nozaki *et al.*, 1997), and rat liver 5 α -reductase

Tabel 2. Cytotoxic properties of compounds 1-9

Compounds	Oligostilbenoids	P-388 (LC ₅₀ µg/ml)
(-)-ε-Viniferin (1)	Dimer	7.8
(+)-Balanocarpol (2)	Dimer	13.5
Shoreaphenol (3)	Dimer	43.0
Pauciflorol B (4)	Trimer	3.1
(+)-Isohopeaphenol (5)	Tetramer	36.0
(-)-Hopeaphenol (6)	Tetramer	5.5
(+)-α-Viniferin (7)	Trimer	18.0
Resveratrol 12C-glucopyranoside (8)	Monomer C-glucoside	>100
Diptoindonesin A (9)	Dimer C-glucoside	>100

inhibitory (Hirano *et al.*, 2001) activities. In the case of compounds 5 and 6, both are tetramerstilbenoids, but as diastereomers exhibit significantly different activities.

4. Conclusions

Eight known oligostilbenoids, (-)-ε-viniferin (1), (+)-balanocarpol (2), shoreaphenol (3), pauciflorol B (4), (+)-isohopeaphenol (5), (-)-hopeaphenol (6), (-)-α-viniferin (7), and diptoindonesin A (9), and a resveratrol C-glucoside, resveratrol-12C-glucopyranoside (8), have been isolated from two *Shorea* plants, *S. javanica* and *S. ovalis*. The structure of these compounds was identified based spectroscopic data, including UV, IR, and NMR spectra. The cytotoxic properties of compounds 1-9 were evaluated against murine leukemia P-388 cells, and resulted that compounds 4 and 6 were the most active. The degree of cytotoxic properties seems not to relate to the molecular size of oligostilbenoids, and glucosylation of the oligostilbenoids abolishes cytotoxicities.

5. Acknowledgement

The authors wish to thank the staff of Herbarium Bogorinse, Bogor, Indonesia, for identification of the plant. Financial assistance from Competitive Grant (No. 239/P4T/DPPM/PHBXI/III/2003), Education Ministry of Republic Indonesia, is gratefully acknowledged.

6. References

- Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbot B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R., (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, **48**, 589-601.
- Aminah S.A., Achmad S.A., Aimi N., Ghisalberti E.L., Hakim E.H., Kitajima M., Syah Y.M., Takayama, H., (2002). Diptoindonesin A, a new C-glucoside of ε-viniferin from *Shorea seminis* (Dipterocarpaceae), *Fitoterapia*, **73**, 501-507.
- Bokei M., Diyasena M.N.C., Gunatilaka A.A.L., Kraus W., Sotheeswaran S., (1988). Canaliculol, an anti-fungal resveratrol trimer from *Stemonoporus canaliculatus* *Phytochemistry*, **27**, 377-380.
- Cichewicz R.H. and Kouzi S.A., (2002). Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. In: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 26 (Bioactive Natural Products, (Part G)), Elsevier, pp. 507-579.
- Gunawardena Y.A.G.P., Sotheeswaran S., Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., Bladon P., (1986). Another antibacterial polyphenol, copalliferol B from *Vateria copallifera* (Dipterocarpaceae), *Phytochemistry*, **25**, 1498-1500.
- Hakim E.H., (2002). Oligostilbenoid from dipterocarpaceous plants. *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, **2**, 1-19.
- Hirano Y., Kondo R., Sakai K., (2001). Compounds inhibitory to rat liver 5 α-reductase from tropical commercial wood species: resveratrol trimers from melapi (*Shorea* sp.), *J. Wood Sci.*, **47**, 308-312.

**Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Laily bin Din, Emilio L. Ghisalberti,
Euis H. Hakim, Lia D. Juliawaty, Jalifah Latip and Ikram M. Said**

- Ito T., Akao Y., Yi H., Oguchi K., Matsumoto K., Tanaka T., Iinuma M., Nozawa, Y., (2003). Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C, *Carcinogenesis*, **24**, 1489-1497.
- Ito T., Tanaka T., Ido Y., Nakaya K-I, Iinuma M., Sudarsono, R., (2000). Stilbenoids isolated from stem bark of *Shorea hemsleyana*, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1001-1005.
- Ito T., Tanaka T., Nakaya K-I, Iinuma M., Iliya I., Nakaya K-I., Ali Z., Takahashi Y., Sawa R., Shirataki Y., Murata J., Darnaedi D., (2003). New resveratrol oligomers in the stem bark of *Vatica pauciflora*, *Tetrahedron*, **59**, 5347-5363.
- Kinakata S., Ikezawa T., Yasukawa K., Yamanouchi S., Takido M., Sung H.-K., Kim I.-H., (1990). (+)- α -Viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 432-435.
- Nozaki H, Hayashi H, Hayashi K, Ohira S, Ikeda S, Iinuma M, Tanaka T, Ohyama M, Tsutsui K, Takaoka D, Yamada M., (1997). *39th Symposium on the chemistry of natural products*, 571.
- Oshima Y., Kamijou A., Ohizumi Y., Niwa M., Ito J., Hishamichi K., Takeshita M., (1996). Novel oligostilbenes from *Vitis coignetiae*, *Tetrahedron*, **49**, 5801-5804.
- Saraswathy A.K., Purushothaman K.K., Patra A., Dey A.K., Kundu A.B., (1992). Shoreaphenol, a polyphenol from *Shorea robusta* Gaertn., *Indian Drugs*, **26**, 574-575.
- Satyajit D.S., Pensri W., Laurence D., (1999). *Tetrahedron*, **55**, 513.
- Seo E.-K., Chai H., Constant H.L., Santisuk T., Reutrakul V., Beecher C.W.W., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., (1999). Resveratrol tetramers from *Vatica dyosporoides*, *J Org. Chem.* **64**, 6976-.
- Suhartati T., Achmad S.A., Aimi N., Hakim E.H., Kitajima M., Takayama H. and Takeya K., (2001). Artoindonesianin L, a new prenylated flavone with cytotoxic activity from *Artocarpus rotunda*. *Fitoterapia*, **72**, 912-918.
- Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., Bladon P., (1987). Distichol, an antibacterial polyphenol from *Shorea disticha*, *Phytochemistry*, **26**, 799-801.
- Syah Y.M., Achmad S.A., Ghisalberti E.L., Hakim E.H., Makmur L. and Mujahidin D., (2001). Artoindonesianins G-I, three new isoprenylated flavones from *Artocarpus lanceifolius*, *Fitoterapia*, **72**, 765-773.
- Syah Y.M., Aminah N.S., Hakim E.H., Aimi N., Kitajima M., Takayama H. and Achmad S.A., (2003). Two oligostilbenes, *cis*- and *trans*-diptoindonesin B, from *Dryobalanops oblongifolia*, *Phytochemistry*, **63**, 913-917.
- Syah Y.M., Achmad S.A., Ghisalberti E.L., Hakim E.H. and Mujahidin D., (2004). Two new cytotoxic isoprenylated flavones, artoindonesianins U and V, from the heartwood of *Artocarpus champeden*, *Fitoterapia*, **75**, 134-140.
- Tanaka T., Ito T., Nakaya K., Iinuma M., Takahashi Y., Naganawa H., Matsuura, N., Ubukata M., (2000). Vaticanol D, a novel resveratrol hexamer isolated from *Vatica rassak*, *Tetrahedron Lett.*, **41**, 7929-7932.
- Zgoda-Pols J.R., Alan J.F., Lew B.K., John R.P., (2002). Antimicrobial resveratrol tetramers from stem bark of *Vatica oblongifolia* ssp. *oblongifolia*, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1554-1559.

Synthesis, Structures and Bioactivity of Some Diorganotin(IV) Bis(hydroxamates); Crystal Structures of $R_2Sn[\sigma\text{-NO}_2C_6H_4CONR'O]_2$ (R= Me and Bu; R'= methyl and tolyl)

Farina, Yang*¹⁾, Elhadi Elbay Saad¹⁾, Bohari M. Yamin¹⁾, S. H. Inayat-Hussain²⁾, A. I. Mohd. Hasrol²⁾, Yip Foo Win¹⁾, Ibrahim Baba¹⁾, Abdul Hamid Othman¹⁾, Ng Seik Weng,³⁾ and A. Manaf Ali⁴⁾

¹⁾School of Chemical Sciences & Food Technology, ²⁾Department of Biomedical Sciences
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Malaysia

³⁾Department of Chemistry, Universiti Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁴⁾Department of Biotechnology, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Malaysia

Abstract

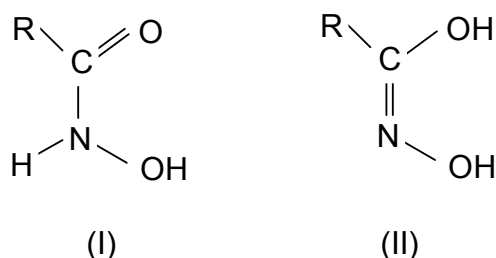
Some of diorganotin(IV) derivatives of hydroxamic acids $\sigma\text{-NO}_2C_6H_4COROH$ (R= methyl and tolyl) were synthesised by refluxing diorganotin oxide and the respective free ligand using a Dean and Stark water separator. The N-methyl σ -nitrobenzohydroxamic acid and N-tolyl σ -nitrobenzohydroxamic acid were derived from the corresponding σ -nitrobenzoyl chloride and N-methyl- and N-tolylhydroxylamine in the presence of sodium hydrogen carbonate. The isolated complexes are characterized by IR, ¹H, ¹³C and ¹¹⁹Sn spectroscopic techniques in combination with elemental analysis. The dimethyl and dibutyltin(IV) complexes afforded single crystals suitable for X-ray diffraction studies. The crystal structures of dimethyl and dibutyltin complexes 1, 2, 4 and 5 $R_2Sn[\sigma\text{-NO}_2C_6H_4CONR'O]_2$ where R= methyl and n-butyl; R'= methyl and tolyl, respectively showed that the geometry at the tin atom exist in a skew-trapezoidal bipyramid with two bidentate hydroxamates and two organic substituents defining a C-Sn-C angle of 147.8(2)°, 147.0(3)°, 146.3(2)° and 145.8(2)° respectively. The coordination mode occurs by deprotonation of the hydroxy group and subsequent (O,O) coordination of the carbonyl oxygen. The free ligand and their complexes were screened against antimicrobial and human promyelocytic leukemic cells (HL-60). The dibutyltin and diphenyltin complexes were found to be more active than the dimethyltin complexes and the respective free ligands. The antimicrobial test showed that these complexes were moderately active.

Keywords: Synthesis, Structure, Bioactivity, Organotin

1. Introduction

Hydroxamic acids are weak organic acids with the general formula RCONHOH. They are well-known as excellent complexation reagents¹. They have a wide variety of analytical and industrial applications such as commercial flotation reagents in extraction metallurgy² and in nuclear fuel processing³. The ability of hydroxamic acids to chelate metal complexes stems mainly from the presence of two tautomeric structures of the anion, the keto form (I) and the enolic form (II) as shown in Scheme 1.

Hydroxamic acid derivatives possess a wide spectrum of biological applications and have been used as antibiotic antagonists⁴ and tumor inhibitors⁵. On the other hand, organotin(IV) compounds have found application in industrial and biological areas such as organic synthesis^{6,7}, PVC stabilization and catalysis⁸⁻¹⁰ and as anti-tumor agents¹¹. Organotin(IV) compounds chelated to oxygen donating ligands have been found to be active towards a number of tumour cells. The results of the testing showed that these oxygen containing organotins were more effective than *cis*-



Scheme 1. Tautomeric structures of hydroxamic acid.

platin¹².

Organotin(IV) hydroxamates formalize an interesting class in bioorganometallic chemistry due to its ability to demonstrate anti-tumor activity¹³⁻¹⁵. The biological activity of the R_2SnL_2 complexes was shown to largely depend on the R group and di-*n*-butyltin derivatives have higher activity than other group derivatives¹¹.

In the last two decades, the synthesis, physicochemical properties and structure determination of organotin hydroxamates have been the subject of various studies¹⁶⁻¹⁸. As a rule, the hydroxamic acid ligand is shown to be bidentate as a result of carbonyl coordination to tin atom, thus causing significantly substantial reduction in the infrared carbonyl stretching frequencies relative to that for the free hydroxylamines^{19, 20}. However, only a few X-ray structures determinations of organotin *N*-substituted hydroxylamine derivatives are available.

This paper will entail a description of the syntheses and characterization of diorganotin(IV) bishydroxamates of the general formula $R_2Sn[o-NO_2C_6H_4CONR'O]_2$ (R= methyl, *n*-butyl and phenyl; R'= methyl and tolyl). Infrared, ¹H and ¹³C spectroscopic techniques including ¹¹⁹Sn were used in the characterization of the compounds and the structure of dimethyltin and di-*n*-butyltin bis(*N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamates) $R_2Sn[o-NO_2C_6H_4CONR'O]_2$ (R= methyl and butyl; R'= methyl and tolyl) were determined by X-ray crystallography. The free ligand and their complexes were screened for cytotoxicity activity against human promyelocytic leukemic cells (HL-60) and antimicrobial properties.

2. Experimental

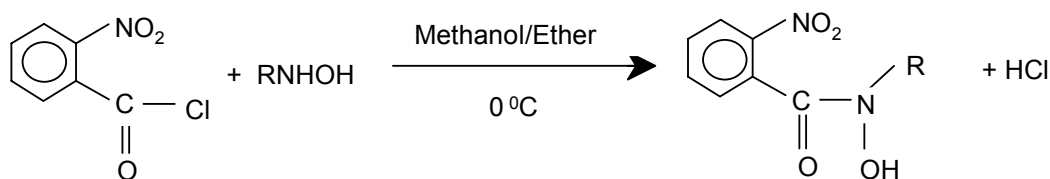
Material and Synthesis

The reagents and solvents used were reagent grade and used as supplied. Dimethyl and diphenyl oxides were prepared by alkaline hydrolysis of dimethyl- and diphenyltin(IV) chlorides²¹. Dibutyltin oxide is a commercial product. *N*-methyl- (I) and *N*-tolyl (II) *o*-nitrobenzohydroxamic acids were obtained by reaction of the appropriate *o*-nitrobenzoyl chloride and *N*-methyl- and *N*-tolylhydroxylamine in the presence of sodium hydrogen carbonate²² as shown in Scheme 1.

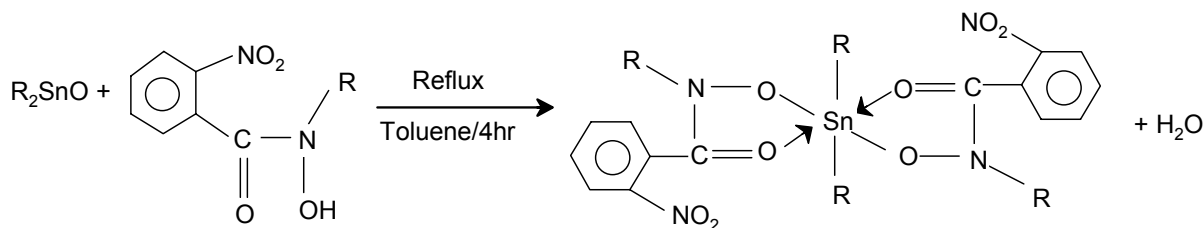
Dialkyl and diphenyltin(IV) bis(hydroxamates) complexes were similarly synthesised according to the method reported²³ with some modification in the work-up procedure. Dimethyltin, dibutyltin and diphenyltin oxides and *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids were mixed, in a stoichiometric 1:2 ratio in toluene and refluxed for 4 h separately according to Scheme 2. The reaction mixture was cooled and filtered. The filtrate was reduced under vacuum to a small volume and the orange crystalline solids of dimethyl- (1,4), dibutyl- (2,5) or yellow of diphenyltin(IV) (3,6) bis(*N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamates) respectively were precipitated by addition of petroleum ether (40 - 60 °C). Single crystals suitable for X-ray diffraction of dimethyl- and dibutyltin complexes were obtained upon slow vaporization from chloroform and methanol solution after addition of petroleum ether.

Elemental Analysis and Spectroscopic Technique

Elemental C, H and N analysis were carried out on a Fison EA 1108 CHN-S analyser. Tin was determined gravimetrically, by igniting a known quantity of each complex to SnO₂. Infrared spectra were recorded on a Perkin-



Scheme 1. Reaction of *o*-nitrobenzoyl chloride with *N*-methyl- and *N*-tolylhydroxylamine



Scheme 2. Reaction of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids with diorganotin oxides

Elmer FT-IR model GX infrared spectrophotometer from 370-4000 cm^{-1} as KBr discs. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a JEOL ECP 400 MHz spectrometer in CDCl_3 , relative to the internal standard tetramethylsilane (TMS). Melting points were determined on an Electrothermal 9300 instrument.

Single Crystal X-ray diffraction studies

Orange crystals with regular shapes of **1**, **2**, **4** and **5** suitable for crystallographic investigation were mounted on a Bruker Smart APEX CCD area detector diffractometer equipped with graphite monochromatized $\text{Mo-K}\alpha$ 0.71073 Å radiation in each case. X-ray diffraction measurements, were, and performed at room temperature. A total 14330, 32919, 19850 and 22563 reflections of which 5120, 6745, 7112 and 8589 independent ones ($R_{\text{int}} = 0.0300, 0.0526, 0.0256$ and 0.0203) were collected using $\omega/2\theta$ scan technique up to $2\theta_{\text{max}} = 55.22^\circ, 56.58^\circ, 55.12^\circ$ and 55.10° for compounds **1**, **2**, **4** and **5**, respectively. Structures under study were solved by direct methods with SHELXL-90²⁴ and refined using the full matrix least-square techniques on F^2 with SHELXL-97²⁵ programs. Non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Final refinement on 293, 341, 401 and 444 parameters converged to $R=0.0406, R=0.0703, R=0.0415$ and $R=0.0449$ for 4689, 3976, 6097 and 6731 $I > 2\sigma(I)$ reflections. The highest peaks in the final

difference map in the **1**, **2**, **4** and **5** complexes were 2.671, 0.859, 2.039 and 0.943 $\text{e}\text{\AA}^{-3}$ respectively. The crystallographic numbering schemes used for **1**, **2**, **4** and **5** are shown in Figs. 1, 2, 3 and 4 which, were, drawn as ORTEP plots²⁶ at 50% probability ellipsoids.

Crystals Data:

Compound **1** $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_9\text{Sn}$, $FM=557.09$, Triclinic, $P-1$, $a=8.2627(1)$ Å, $b=10.2517(1)$ Å, $c=13.580(2)$ Å, $V=1108.9(3)$ Å³, $Z=2$, $D_{x\text{-ray}}=1.668$ g/cm^{-3} , $F(000)=560$, $\mu=1.209$ mm^{-1} .

Compound **2** $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{8.5}\text{Sn}$, $FM=632.23$, Orthorhombic, $Pccn$, $a=12.9651(8)$ Å, $b=16.9781(1)$ Å, $c=25.3996(1)$ Å, $V=5591.0(4)$ Å³, $Z=8$, $D_{x\text{-ray}}=1.502$ g/cm^{-3} , $F(000)=2584$, $\mu=0.967$ mm^{-1} .

Compound **4** $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_9\text{Sn}$, $FM=709.27$, Triclinic, $P-1$, $a=10.2823(4)$ Å, $b=12.5940(5)$ Å, $c=13.640(7)$ Å, $V=1540.8(8)$ Å³, $Z=2$, $D_{x\text{-ray}}=1.529$ g/cm^{-3} , $F(000)=720$, $\mu=0.888$ mm^{-1} .

Compound **5** $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_8\text{Sn}$, $FM=775.41$, Monoclinic, $P2_1/c$, $a=14.6891(9)$ Å, $b=16.3774(1)$ Å, $c=16.8952(1)$ Å, $V=3771.9(4)$ Å³, $Z=4$, $D_{x\text{-ray}}=1.365$ g/cm^{-3} , $F(000)=1592$, $\mu=0.730$ mm^{-1} .

Biological Activity

Antimicrobial

Eight pathogenic microbials were used to test the biological potential of the ligands and their

complexes. They were Methicillin resistant staphylococcus (MRSA), Bacillus subtilis wild type (B29), S. typhimurium, Pseudomonas aeruginosa (60690), Candida albicans (C.A.), Aspergillus ochraceus (398), Saccaromyces ceciricae (20341) and Candida lypolytica (2075).

Antimicrobial activity of each sample was qualitatively determined by a modified disc diffusion method²⁷. Antimicrobial activity was indicated by the presence of clear inhibition zones around the discs. Commercially available streptomycin (Sigma, USA) was used as antibacterial control.

Cytotoxic assay

The HL-60 (Human promyocytic leukemia) cells line was obtained from the National Cancer Institute, USA. The cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cytotoxicity was

determined using the microtitration of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma, USA) as reported by Mosmann²⁸. Controls that contained only cells were included for each sample.

3. Results and Discussion

Elemental analysis and melting point data obtained were in good agreement with the values calculated for the proposed empirical formula as shown in Table 1.

The most relevant infrared data of the *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids and their diorganotin(IV) complexes are given in Table 2. By comparison with the data reported for other organotin(IV) hydroxamates, we suggest the following assignments for these complexes. The infrared spectra of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids exhibit, a broad band at 3100 cm⁻¹ (*N*-methyl *o*-

Table 1. Elemental analysis and melting point data

Cpd.	Product	Colour	Yield	MP (°C)	%C	%H	%N	%Sn
I	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ OH	Yellowish	70%	170.1-171.5	48.46 (48.98)	4.32 (4.11)	14.13 (14.08)	-
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	Orange	83%	200.5-203.5	40.14 (40.08)	3.72 (3.74)	10.00 (10.38)	18.37 (22.06)
2	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	78%	154.1-156.5	46.16 (46.23)	5.01 (5.17)	8.29 (8.98)	17.91 (19.09)
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	Yellow	83%	174.4-176.6	50.62 (50.68)	8.33 (8.44)	2.93 (3.64)	17.73 (17.93)
II	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ OH	Yellow	70%	171.1-172.5	61.09 (61.76)	4.09 (4.44)	9.35 (10.28)	-
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	Orange	73%	97.7-99.9	51.12 (52.10)	4.75 (4.10)	6.22 (8.10)	15.84 (17.21)
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	69%	143.5-135.9	55.67 (55.74)	5.18 (5.19)	6.27 (7.22)	15.04 (15.34)
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	Yellow	70%	101.6-103.5	58.52 (58.90)	3.72 (3.95)	6.99 (6.86)	10.46 (14.59)

Table 2. Important IR absorption bands (cm⁻¹)

Cpd.	Product	ν(OH)	ν(C=O)	ν(C-N)	ν(Sn-O)	ν(Sn-C)
I	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ OH	3100	1630	1445	-	-
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	1611	1499	552	416
2	Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	1607	1497	529	411
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	1607	1495	544	449
II	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ OH	3126	1637	1422	-	-
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	1565	1442	563	443
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	1587	1444	546	437
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	1530	1431	564	448

Table 3. Important ^1H NMR spectral data

Cpd.	Product	(δ, ppm)		
		OH	Aromatic	Aliphatic
I	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{OH}$	nv	7.95-8.17 m (4H)	N-CH ₃ : 3.28s (3H)
1	$\text{Me}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2^*$	-	7.60-8.29m (8H)	N-CH ₃ : 6.34s (3H) Sn-CH ₃ : 0.92s (6H)
2	$\text{Bu}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2$	-	7.56-8.27m (8H)	N-CH ₃ : 3.36s (6H) Sn-(CH ₂) ₃ : 1.33-1.74m (12H) -(CH ₃): 0.91t (6H)
3	$\text{Ph}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2^*$	-	7.33-8.32m (18H)	N-CH ₃ : 3.34s (6H)
II	$o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3\text{OH}$	9.07 b (1H)	6.99-8.011 m (8H)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$: 2.59s (3H)
4	$\text{Me}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3\text{O}]_2^*$	-	7.02-8.01m (16H)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$: 2.29s (6H) Sn-CH ₃ : 1.07s (6H)
5	$n\text{-Bu}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3\text{O}]_2$	-	7.09-8.13m (16H)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$: 2.35s (6H) Sn-(CH ₂) ₃ : 1.71-2.04m (12H) -(CH ₃): 1.14t (6H)
6	$\text{Ph}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3\text{O}]_2$	-	7.03-8.06m (18H)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$: 2.27s (6H)

s= singlet, t= triplet, m= multiplet, nv= non-visible,

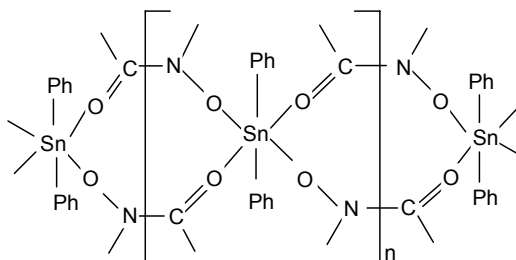


Figure 2. Polymeric structure of diphenyltin(IV) complexes

nitrobenzohydroxamic acid) and 3126 cm^{-1} (*N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid), which, is due to the OH group. These bands disappear in the spectra of the complexes suggesting the deprotonation of the hydroxamates group on complex formation. The carbonyl (C=O) stretching vibration, located at 1630 cm^{-1} (*N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid) and 1637 cm^{-1} (*N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid), is lowered in all diorganotin(IV) complexes by $19\text{-}107\text{ cm}^{-1}$, indicating that the carbonyl group is involved in complex formation.

Strong bands at 1445 cm^{-1} and 1422 cm^{-1} , in the spectra of the free ligands, may be attributed to the C-N stretching frequencies. However, on complex formation these bands are shifted to higher frequencies by $9\text{-}54\text{ cm}^{-1}$. The carbonyl oxygen, which serves as a donor atom with electron withdrawal from the carbonyl group, will in turn increase the electron density on the C-N group. Therefore, a lowering of the carbonyl frequency and an increase of the C-N frequency are expected in the infrared spectra of the complexes¹. The coordination through

Table 4. ^{13}C NMR data for diorganotin(IV) complexes and the free ligands.

Cpd.	Product	(δ, ppm)		
		C=O	Aromatic	Aliphatic
I	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ OH	161.9	124.9-134.4	N-CH ₃ : 36.6
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	160.2	124.8-148.7	N-CH ₃ : 39.5 Sn-CH ₃ : 7.4
2	Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	160.0	125.0-145.9	N-CH ₃ : 39.7 Sn-Bu: 13.8 26.6 27.1 27.9
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O]	159.7 159.6 159.1	124.9-147.6	N-CH ₃ : 39.9 39.6
II	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ OH	162.0	122.1-155.1	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ : 21.1
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	161.8	124.7-146.7	Sn-CH ₃ : 7.2 C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ : 21.1
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	160.6	124.7-146.4	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ : 21.1 Sn-Bu: 14.0 26.6 27.2 27.9
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	161.7	125.8-148.1	C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ : 21.2

Table 5 Correlation between $^2J(\text{Sn-H})$ and $^1J(\text{Sn-C})$ coupling constants (Hz) and C-Sn-C angles (θ , °) including ^{119}Sn (δ , ppm) chemical shifts in diorganotin(IV) complexes **1**, **2**, **3**, **4**, **5** and **6**.

No.	Compound	^1H		^{13}C		^{119}Sn
		$^2J(\text{Sn-H})$	C-Sn-C ^a	$^1J(\text{Sn-C})$	C-Sn-C	
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	87.15	140.6 ^a	784.87	145.6 ^b	-189.57
2	Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	-	741.82	146.7 ^c	-230.26
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	-	937.85	168.5 ^b	414.03
						-206.86
						-354.34
						-414.90
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	84.22	136.9 ^a	745.67	142.2 ^b	-176.16
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	-	724.14	143.6 ^c	-218.26
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	-	891.72	163.9 ^b	-203.04
						-348.69

$$^a \theta = 0.0161(|^2J|)^2 - 1.32|^2J| + 133.4^{29}$$

$$^b |^1J| = 9.99\theta - 746^{30}$$

$$^c \theta = 0.178|^2J| + 14.74^{31}$$

the carbonyl oxygen and the deprotonation of hydroxy group is further supported by the occurrence of new bands at 529 – 564 cm⁻¹ in the spectra of the complexes which, may be assigned to $\nu(\text{Sn-O})$ ²⁰.

The conclusion drawn from ^1H NMR spectral studies, lends additional support to the manner of bonding discussed above. The ^1H NMR spectral data of the *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids and their diorganotin(IV) complexes have been recorded and listed in Table 3. The signal at 9.07 ppm in

the case of *N*-tolyl *o*-nitrobenzo- hydroxamic acid is due to the intramolecularly hydrogen bonded hydroxy proton, the peak is not-visible in the spectrum of *N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid due to the rapid exchange with the water molecule present in the solvent. However, this peak disappears in the ^1H NMR spectra of the organotin complexes indicating, thereby, the deprotonation on complexation with the organotin moiety. The resonance at 3.28 ppm in the *N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid has been assigned to the methyl protons attached to

the nitrogen atom, which remains unaltered on complexation and thus clearly indicates the non-involvement of this group in the complex formation. The resonance at 2.95 ppm has been assigned to the methyl protons on the aromatic ring of the *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid. For the dimethyltin complexes of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids (**1,4**) the methyl protons attached to the tin atom appear as a singlet at 0.92 ppm and 1.07 ppm respectively. The butyl protons in the dibutyltin complexes of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids appear as a multiplet and a triplet in the range 1.71 – 2.04 ppm and at 0.91-1.14 ppm due to $-(CH_2)_3$ and the terminal CH_3 groups respectively. The complex pattern observed in the region 7.03 – 8.32 ppm in all complexes is due to the overlapping resonances of the aromatic ligand and phenyl group protons bonded to tin atom in the diphenyltin complexes of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids. This observation supports the infrared data. In all complexes the signals for all types of protons have been identified and the number of protons of various groups observed from the integration curves is found to be equivalent to the total number of protons calculated from the expected molecular formula. This interpretation, which is based on 1H NMR results is further supported by a ^{13}C NMR and X-ray structural studies of four representative complexes **1, 2, 4** and **5**.

The ^{13}C NMR chemical shifts of the *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid and their diorganotin(IV) complexes are listed in Table 4. For each compound, the number of signals observed is in good agreement with the molecular formula except for *N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid. The spectra are generally consistent with the conclusion drawn from 1H NMR results. In the case of dimethyl- and dibutyltin(IV) complexes, the spectra exhibited only one set of resonances, indicating the presence of only one structure in solution whereas in the case of diphenyltin(IV) complexes the spectra exhibited two sets of resonances indicating the presence of dimeric or oligomeric or polymeric structures in solution as shown in Figure 2. The structures are most probably due to the intermolecular bridging of the ligands as proved by ^{119}Sn NMR spectra, which exhibit more than one signal.

The carbonyl signals of *N*-methyl- and *N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamic acids occur as a sharp singlet at 161.9 and 162.0 ppm. On complexation these signals shift slightly upfield to 160.2, 160.0, 159.7-159.1, 161.8, 160.6 and 161.7 ppm for complexes **1, 2, 3, 4, 5** and **6** respectively. This shift indicates the low interaction between the carbonyl oxygen of the hydroxamates and the tin atom. The carbon signal bonded to nitrogen, which appears at 36.6 ppm in the free ligand of *N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamic acid shifts downfield, to 39.5, 39.6 and 39.7 ppm for complexes **1, 2** and **3** respectively. The downfield shift may be attributed to steric effect on complex formation. The carbon signal attached to the tin atom in dimethyltin complex appears at 7.4 ppm for complex (**1**) and 7.2 ppm for complex (**4**). The butyl carbon in the dibutyltin complex appeared at 14.0-26.9 ppm region. The carbon signal in the aromatic region appeared at 124.1 – 145.5 ppm. The peak at 146.3 ppm is due to the quaternary carbon to which the nitro group is attached.

The C-Sn-C angles may be calculated from NMR parameters and the geometry about the tin atom may be postulated. The calculated C-Sn-C angles are based on the reported relationships between $^2J(Sn-H)$ and $^1J(Sn-C)$ coupling constants and the chemical shifts obtained from tin NMR recorded in $CDCl_3$ are shown in Table 5. The values of the $^2J(Sn-H)$ and $^1J(Sn-C)$ coupling constants fall in the region for six-coordinated tin in the case of diorganotin derivatives²⁹. Structures **1, 2, 4** and **5** in solution display a C-Sn-C angle close to those found in solid state observed from X-ray crystallography. The values might suggest that in solution the dimethyl- and dibutyltin(IV) derivatives is a skew-trapezoidal bipyramid and the basic structural features of the solid state phase remain in $CDCl_3$. Similar results were reported for related compounds^{17,18}.

The ^{119}Sn resonances for the diorganotin(IV) complexes appear as sharp signals and their chemical shifts fall in the range for six-coordinated tin³². It is well known that an increase in the coordination of tin should give rise to a high field shift of δ ^{119}Sn ³³. The δ ^{119}Sn values are also dependent on the ligand and show an upfield shift with increasing distance between the two coordinating atoms³⁴.

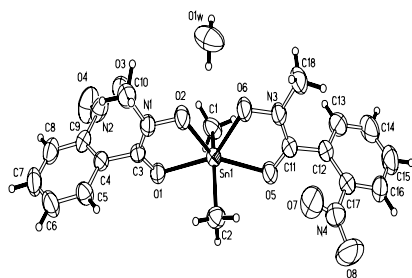


Figure 3. Structure and atomic numbering scheme for $\text{Me}_2\text{Sn}[\text{o-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1)

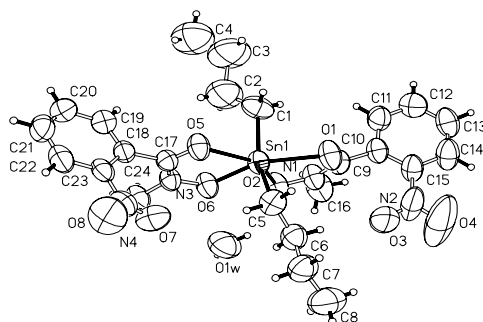


Figure 4. Structure and atomic numbering scheme for $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[\text{o-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (2)

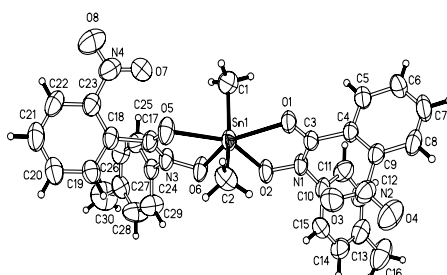


Figure 5. Structure and atomic numbering scheme for $\text{Me}_2\text{Sn-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-p-CH}_3\text{O}]_2$ (4)

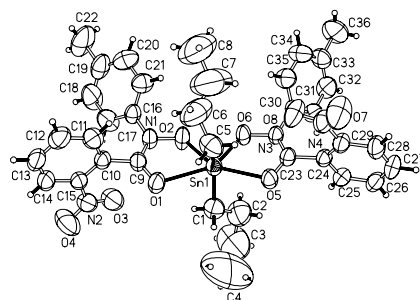


Figure 6. Structure and atomic numbering scheme for $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[\text{o-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONC}_6\text{H}_4\text{-p-CH}_3\text{O}]_2$ (5)

The values of $\delta^{119}\text{Sn}$ in addition depend on the grouping attached to tin. For complexes **3** and **6**, which have phenyl substituents on tin, δ

^{119}Sn values appear at (414.03, -206.86, -354.34 and -414.90) and (-203.04 and -348.69) respectively, but for the complexes **1**, **4**, **2** and **5** which have methyl and butyl substituents on

Table 6. Bond lengths [Å] and angles [°] for compounds **1**, **2**, **4** and **5**.

Bond	d(Å)	Bond	ω (deg)	Bond	ω (deg)
Compound (1)					
Sn(1)-C(2)	2.097(3)			C(11)-N(3)-C(2)	129.0(3)
Sn(1)-C(1)	2.098(3)	C(2)-Sn(1)-C(1)	147.83(2)	O(6)-N(3)-C(2)	112.7(3)
Sn(1)-O(2)	2.118(2)	C(1)-Sn(1)-O(1)	83.96(1)	O(1)-C(3)-N(1)	121.7(3)
Sn(1)-O(6)	2.123(2)	O(2)-Sn(1)-O(1)	71.00(8)	O(1)-C(3)-C(4)	119.8(3)
Sn(1)-O(5)	2.380(2)	O(6)-Sn(1)-O(1)	140.93(8)	N(1)-C(3)-C(4)	118.4(3)
Sn(1)-O(1)	2.383(2)	O(5)-Sn(1)-O(1)	147.89(8)	O(5)-C(11)-N(3)	121.9(3)
O(1)-C(3)	1.246(4)	C(3)-O(1)-Sn(1)	111.08(2)		
O(2)-N(1)	1.373(3)	N(1)-O(2)-Sn(1)	116.98(2)	O(5)-C(11)-C(1)	119.3(3)
O(5)-C(1)	1.252(4)	C(11)-O(5)-Sn(1)	111.3(2)	N(3)-C(11)-C(1)	118.6(3)
O(6)-N(3)	1.373(3)	N(3)-O(6)-Sn(1)	117.70(2)		
N(1)-C(3)	1.298(4)	C(3)-N(1)-O(2)	118.9(3)		
N(3)-C(1)	1.308(4)	C(3)-N(1)-C(1)	128.6(3)		
N(1)-C(3)	1.317(4)	O(2)-N(1)-C(1)	112.3(3)		
		C(11)-N(3)-O(6)	118.2(3)		
Compound (2)					
Sn(1)-C(1)	2.100(7)	C(1)-Sn(1)-O(2)	101.2(3)	C(5)-Sn(1)-O(5)	85.47(2)
Sn(1)-O(2)	2.111(4)	C(1)-Sn(1)-C(5)	147.0(3)	O(6)-Sn(1)-O(5)	71.13(1)
Sn(1)-C(5)	2.112(6)	O(2)-Sn(1)-C(5)	104.4(2)	O(1)-Sn(1)-O(5)	143.85(1)
Sn(1)-O(6)	2.117(4)	C(1)-Sn(1)-O(6)	105.8(2)	C(9)-O(1)-Sn(1)	109.4(4)
Sn(1)-O(1)	2.384(4)	O(2)-Sn(1)-O(6)	73.88(2)	N(1)-O(2)-Sn(1)	115.5(3)
Sn(1)-O(5)	2.410(4)	C(5)-Sn(1)-O(6)	101.1(2)	C(17)-O(5)-Sn(1)	111.3(4)
O(1)-C(9)	1.260(7)	C(1)-Sn(1)-O(1)	83.4(3)	N(3)-O(6)-Sn(1)	117.3(3)
O(2)-N(1)	1.375(6)	O(2)-Sn(1)-O(1)	71.21(1)	C(9)-N(1)-O(2)	119.3(5)
O(5)-C(2)	1.243(6)	C(5)-Sn(1)-O(1)	85.4(2)	C(9)-N(1)-C(16)	128.2(5)
O(6)-N(3)	1.370(6)	O(6)-Sn(1)-O(1)	145.01(1)	O(2)-N(1)-C(16)	112.5(5)
N(1)-C(9)	1.296(7)	C(1)-Sn(1)-O(5)	85.4(3)	C(17)-N(3)-O(6)	119.6(4)
N(3)-C(2)	1.330(7)	O(2)-Sn(1)-O(5)	144.87(2)	C(17)-N(3)-C(2)	128.0(5)
Compound (4)					
Sn(1)-C(1)	2.093(4)	C(1)-Sn(1)-C(2)	146.29(2)	O(2)-Sn(1)-O(1)	71.49(7)
Sn(1)-C(2)	2.094(4)	C(1)-Sn(1)-O(2)	106.46(1)	O(6)-Sn(1)-O(1)	144.60(8)
Sn(1)-O(2)	2.126(2)	C(2)-Sn(1)-O(2)	100.53(1)	O(5)-Sn(1)-O(1)	143.97(8)
Sn(1)-O(6)	2.141(2)	C(1)-Sn(1)-O(6)	100.12(1)	C(3)-O(1)-Sn(1)	110.80(2)
Sn(1)-O(5)	2.376(2)	C(2)-Sn(1)-O(6)	106.63(1)	N(1)-O(2)-Sn(1)	116.84(2)
Sn(1)-O(1)	2.395(2)	O(2)-Sn(1)-O(6)	73.71(8)	C(17)-O(5)-Sn(1)	110.86(2)
O(1)-C(3)	1.251(4)	C(1)-Sn(1)-O(5)	85.68(1)	C(3)-N(1)-O(2)	119.0(2)
O(2)-N(1)	1.380(3)			C(3)-N(1)-C(1)	127.2(2)
O(3)-N(2)	1.214(4)	C(2)-Sn(1)-O(5)	83.90(1)	O(2)-N(1)-C(1)	113.4(2)
O(4)-N(2)	1.215(4)	O(2)-Sn(1)-O(5)	144.44(8)	C(17)-N(3)-O(6)	118.8(2)
O(5)-C(17)	1.248(4)	O(6)-Sn(1)-O(5)	71.26(8)	O(1)-C(3)-N(1)	121.8(3)
O(6)-N(3)	1.381(3)	C(1)-Sn(1)-O(1)	83.74(1)	N(1)-C(3)-C(4)	118.4(3)
		C(2)-Sn(1)-O(1)	86.10(1)		
Compound (5)					
Sn(1)-C(1)	2.100(5)	C(1)-Sn(1)-O(2)	103.68(2)	C(5)-Sn(1)-O(5)	82.29(2)
Sn(1)-O(2)	2.102(2)	C(1)-Sn(1)-O(6)	104.59(2)	O(2)-Sn(1)-O(5)	145.20(9)
Sn(1)-O(6)	2.123(3)	O(2)-Sn(1)-O(6)	75.60(9)	O(1)-Sn(1)-O(5)	142.83(9)
Sn(1)-C(5)	2.130(5)	C(1)-Sn(1)-C(5)	145.80(2)	C(9)-O(1)-Sn(1)	110.2(2)
Sn(1)-O(1)	2.376(2)	O(2)-Sn(1)-C(5)	105.24(2)	N(1)-O(2)-Sn(1)	116.25(2)
Sn(1)-O(5)	2.467(2)	O(6)-Sn(1)-C(5)	99.97(2)	C(23)-O(5)-Sn(1)	109.6(2)
O(1)-C(9)	1.258(4)	C(1)-Sn(1)-O(1)	84.34(2)	N(3)-O(6)-Sn(1)	117.6(2)
O(2)-N(1)	1.375(3)	O(2)-Sn(1)-O(1)	71.96(9)	C(9)-N(1)-O(2)	119.5(3)
O(5)-C(2)	1.242(4)	O(6)-Sn(1)-O(1)	147.55(1)	C(23)-N(3)-O(6)	118.3(3)
O(6)-N(3)	1.389(4)	C(5)-Sn(1)-O(1)	87.58(2)	C(23)-N(3)-C(3)	128.0(3)
N(1)-C(9)	1.316(4)	C(1)-Sn(1)-O(5)	84.34(2)		
N(3)-C(2)	1.322(5)	O(6)-Sn(1)-O(5)	69.62(9)		

tin $\delta^{119}\text{Sn}$ values appear at -189.57, -176.16, -230.26 and -218.26 respectively. These differences in the values are comparable with the differences found in starting material

used³⁵. These $\delta^{119}\text{Sn}$ values compare well with the six-coordinated tin compounds of the same class^{17, 18} [values -198 and -182 for dimethyl, -

222, -226 and -236 for dibutyl and -354 and -361 for diphenyl].

The molecular structures of $\text{Me}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ **1**, $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CONCH}_3\text{O}]_2\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ **2**, $\text{Me}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CON}p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{O}]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ **4** and $n\text{-Bu}_2\text{Sn}[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CON}p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{O}]_2$ **5** are shown in Figures 3, 4, 5 and 6 respectively. Selected bond distances and angles are reported in Table 6 for compounds **1**, **2**, **4** and **5**. As expected, the tin(IV) atoms in all complexes investigated by X-ray crystallography were found to be six-coordinated with two organic groups (methyl or butyl) and two ligands. It is clear that the hydroxamates behave as a bidentate agent via two oxygen atoms. In all the structures examined by X-ray crystallography the ONCO skeleton of each ligand is essentially planar, the deviation of tin atoms from these planes being 0.022 Å and 0.012 Å for **1**, -0.088 Å and -0.005 Å for **2**, 0.001 Å and -0.079 Å for **4** and 0.084 Å and 0.056 Å for **5** respectively which is substantially lies out of both planes. The *o*-nitrophenyl group of each hydroxamate group formed dihedral angles of 85.42° and 88.06° in complex **1** and 82.60° and 88.89° in complex **2** with the chelating OCNO planes. The two *o*-nitrophenyl and *p*-methylphenyl groups of each hydroxamate residue form dihedral angles of 83.09°\78.24° and 63.34°\60.24° in complex **4** and 87.22°\84.83° and 66.54°\47.9° in complex **5** with chelating OCNO planes.

The angles subtended by the alkyl groups to the tin centre, C-Sn-C 147.83°, 147.0°, 146.29° and 145.8° for **1**, **2**, **4** and **5** respectively. These values were found to be lie in the range of 122.6-156.9° which have been found in diorganotin bischelate system wherein the organo substitution do not choose *cis*- or *trans*-geometries about the tin atom³⁶. In the structures the two hydroxamates groups are almost equivalent, forming one short covalent and one long coordinate tin to oxygen as shown in Table 6. The structures (**3**), (**4**) and (**6**) contain one, half and one molecules of water respectively which do not affect the geometry around the tin atom.

The coordination mode of hydroxamates was deduced from the bond lengths extended by the tin centre to the oxygen atoms, which were found to be significantly different. For

example, in the complex **1** the Sn-O bonds were found to be at 2.118(2) and 2.383(2) Å while in complex **2**, 2.117(4) and 2.410(4) Å. The corresponding C-O bond lengths values are more characteristic of a double bond¹⁹. The N-O bond lengths on the other hand are more inclined towards a single bond¹⁹. Hence, it may be deduced that the hydroxamate anion chelates as a bidentate entity. The long Sn-O bonds are considerably below the sum of the van der Waals radii for these atoms at 3.70 Å³⁷. The C-O, C-N and N-O bond distances in the coordinated hydroxamate ligands indicate the expected electron delocalisation over the O-C-N-O fragment. The Sn-C bond lengths 2.09 Å in compounds **1** and **4** are much shorter than the Sn-C bond lengths in dimethyltin(IV) dichloride 2.21 Å³⁸. The geometry found about the tin atom in all structures studied here are best described as a skew-trapezoidal bipyramid (STB).

The most important aspect of the structures is the non-participation of the nitro groups in the coordination to the central tin atom. As can be seen from Figures 4, 5, 6 and 7 the nitro groups are directed away from the tin atom. Furthermore, the nitro groups do not make close intermolecular contacts to tin in the crystal lattices. Coordination numbers greater than six are known for diorganotin species^{39, 40}, and would seem that the presence of the bulky phenyl group bound to the nitro groups precludes close contacts with neighbouring tin centre. The structures determination reported here combined with NMR evidence suggest that these compounds adopt monomeric structures in the solid state.

Screening for antimicrobial activity was done on all the compounds. The results of the antimicrobial screening are shown in Table 7. All compounds were inactive against *C. lypolytica* (2075), *C. albicans* (C.A) and *ochraceous* (398) except compound (**3**), which showed moderate activity with inhibition zone of 10 mm against *S. ceciricae* (20341). Compound (**II**) was inactive against all pathogenic microbials. All complexes showed clear inhibition zones of 7 mm and above against *Methicillin resistant sthaphylococcus* (MRSA), *P. aeruginosa* (60690), *S. typhimurium* and *Bacillus subtilis* wild type

Table 7 Qualitative antimicrobial assay results ^a (diameter in mm)

Cpd.	Product	2075	MRSA	60690	S. typhimurium	B29	C.A	398	20341
I	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ OH	-	8	-	-	8	-	-	-
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	14	14	13	14	-	-	-
2	Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-	14	14	12	11	-	-	-
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O]	-	12	13	13	14	-	-	10
II	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ OH	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	14	14	14	13	-	-	-
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	8	8	8	7	-	-	-
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	-	-	-	-	-	-	-	-

Methicillin resistant staphylococcus (MRSA); *Bacillus subtilis* wild type (B29); *S. typhimurium* *P. aeruginosa* (60690); *C. albicans (C.A)*; *A. ochraceous* (398); *S. ceciricae* (20341); *C. lypolytica* (2075); ‘-’, inactive.

^a Diameter of 15 mm and above considered active.

Table 8. Results of screening against leukemic cells (HL-60)

Cpd.	Product	CD ₅₀ (mg cm ³) HL-60
I	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ OH	-
1	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	-
2	Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O] ₂	0.60
3	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONCH ₃ O]	2.00
II	<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ OH	-
4	Me ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	23.0
5	<i>n</i> -Bu ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	0.60
6	Ph ₂ Sn[<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CONC ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃ O] ₂	1.50

‘-’ Inactive

(B29) and considered to be moderately active except complex **6** which was inactive.

The ligands and their complexes were evaluated for cytotoxic activity. The results of the cytotoxicity screening against HL-60 are shown in Table 8. The leukemic cell (HL-60) were inactive to the ligands (**I**) and (**II**) but was found to be sensitive towards the complexes except for complex **1**, which was inactive. According to suggestion by Shier⁴¹ compounds with CD₅₀ values of more than 10-25 µg/ml are considered indicative of weak cytotoxic activity while compounds with CD₅₀ values less than 5 µg/ml are considered to be very active. Compounds with CD₅₀ values from 5-10 µg/ml are designate as moderately active. All complexes showed very strong activity against HL-60 with CD₅₀ values ranging from 0.60 for

complex **2** and **5** to 1.50 and 2.00 for complexes **3** and **6**. Complex **1** showed inactivity whereas complex **4** showed weak activity.

4. Conclusion

The complexes of diorganotin(IV) derivatives of hydroxamic acids with the general formula R₂Sn[*o*-NO₂C₆H₄CONR'O]₂ (R=methyl, butyl and phenyl; R'= CH₃ and *p*-CH₃C₆H₄), were successfully obtained by the azeotropic removal of water generated in reactions between diorganotin(IV) oxide and the relevant *N*-substituted *o*-methoxy- and *o*-nitrobenzohydroxamic acids in toluene as solvent using a *Dean* and *Stark* water separator. Molecular sieve is also used to absorb the water molecules that are generated as a minor product. The isolated complexes are found to

be stable which suggests that the π -system of electrons in the aromatic ring may have a role to play in stabilizing the tin(IV) oxidation state. The complexes are soluble in solvents such as chloroform and DMSO. The spectroscopic investigations of all compounds studied here indicate that the tin atom is six-coordinated and is further supported by X-ray crystal structures of four representative compounds **1**, **2**, **4** and **5**. The dimethyltin(IV) and dibutyltin(IV) complexes gave a distorted octahedron geometry best described as skew-trapezoidal bipyramidal defined by C-Sn-C angles of 147.83°, 147.0°, 146.29° and 145.8° respectively. The free ligands and their complexes were screened against antimicrobial and human promyelocytic leukemic cells (HL-60). The dibutyltin and diphenyltin complexes were found to be more active than the dimethyltin complexes. The antimicrobial test showed that these complexes were moderately active while only one complex has found to be moderately active against one type of fungi.

5. Acknowledgements

We would like to thank the Malaysian Government for funds (IRPA 09-02-02-0133). Mr Elhadi E. Saad is indebted to the General Committee of Education and Scientific Research Libya for financial support. Technical assistance from members of the Faculty of Science and Technology, University Kebangsaan Malaysia is gratefully acknowledged.

Supplementary material

Crystallographic data for the structural analyses of dimethyl-, dibutyltin(IV) bis(*N*-methyl *o*-nitrobenzohydroxamates), dimethyl- and dibutyltin(IV) bis(*N*-tolyl *o*-nitrobenzohydroxamates) **1**, **2**, **4** and **5** complexes have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 224202, CCDC 224200, CCDC 224201 and CCDC 224203. Copies of this information may be obtained free of charge from: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK (fax: + 44-1223-336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk or www: http://www.ccdc.cam.ac.uk).

6. References

Chatterjee B. *Coord. Chem. Rev.* 1978; **26**: 281.
Agrawal Y K. *Rev. Anal. Chem.* 1980; **5**: 3.

Taylor RJ, May I, Wallwork AL. Dennis IS, Hill N J, Galkin BY, Zilberman BY, Fedorov YSJ. *Alloys and Comp.* 1998, **534**: 271.

Neilands JB. *Science* 1967; **156**: 1443.

Maehr H. *Pure Appl. Chem.* 1971; **28**: 603.

Pereyre M, Quintard JP and Raham A. *Tin in Organic Synthesis*, Butterworths, London, 1987;???

Jousseume B, Pereyre M, and Smith PJ, *Chemistry of Tin*, 2nd ed, Blackie, London, 1998, Chap. 9, p. 290.

Plunden SJ, Cusack PA, and Hill R. *The Industrial Uses of Tin Chemical*, The Royal Society of Chemistry, London, 1985.

Evans CJ and Smith PJ, *Chemistry of Tin*, 2nd ed, Blackie, London, 1998, Chap. 2, p. 442.

Evans CJ, and Karpel S. *J. Organomet. Chem. Libr.* 1985; **16**: 83.

Gielen M. *Coord. Chem. Rev.*, 1996; **151**: 41.

Gielen M; Lelieveld P; ve Dos D, Willem R. *Metal Based Anti-Tumour Drugs* 1992; **2**: 29.

Choudhuri SK, Roy PS, Ghoah AK. *Indian J. Chem.* 1984; **A23**: 535.

Choudhuri SK, Dutta SD, Chatterjee R, Chowdhury JR. *Chemotherapy* 1991; **37**: 122.

Chun-Ying W, Pin Y, Lian-Hong W, Li W. *Chinese J. Chem.* 2002; **20**: 453.

Gielen M, *Tin Based Antitumour Drug*, edited by Gielen M., NATO ASI Series, Ser. H: Cell Biology, 1989; Vol. 37.

Petrosyan VS, Yashina NS, Sizova TV, Leonova TV, Aslanov LA, Yatsenko AV, Pellerito L. *Appl. Organomet. Chem.* 1994; **8**: 11.

Drovetskaia TV, Yashina NS, Leonova TV, Lorberth J, Wocadlo S, Massa W, Pebler J. *J. Organomet. Chem.* 1996; **507**: 201.

Harrison PG, King TJ, Richards JA. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1975; **9**: 826.

Das MK, Nath M, Zuckermann JJ. *Inorg. Chim. Acta* 1983; **71**: 49.

Gixasolo MA, Guli G, Rellerito I, Stocco GC. *Appl. Organomet. Chem.* 1995; **9**: 24.

Ulrich H, Sayigh AAR. *J. Chem. Soc.* 1963; 1098.

Harrison PG and Richards JA. *J. Organomet. Chem.* 1980; **185**: 9.

Sheldrick GM. SHELXS-90. 1990. Program for the Automatic Solution of Crystal Structure. Universty of Göttingen. Germany.

Farina, Yang, Elhadi Elbay Saad, Bohari M. Yamin, S. H. Inayat-Hussain, A. I. Mohd. Hasrol, Yip Foo Win, Ibrahim Baba, Abdul Hamid Othman, Ng Seik Weng, and A. Manaf Ali

- Sheldrick GM. SHELXL-97. 1997. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Göttingen. Germany .
- Johnson CK. ORTEP-II. Report ORNL-5138, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee 1976.
- Bauer AW, Kirby MDK, Sherris JC, Turck MD. *Am. J. Clin. Path.* 1966; **45**: 439.
- Mosmann T. *J. Immunol. Meth.* 1983; **65**: 55.
- Lockhart TP, Manders WF. *Inorg. Chem.* 1986; **25**: 892.
- Lockhart TP, Manders WF, Zuckerman JJ. *J. Am. Chem. Soc.* 1985; **107**: 4546.
- Holecek J, Lycka A. *Inorg. Chim. Acta.* 1986; **118**: L15.
- Otera J. *J. Organomet. Chem.* 1981; **221**: 57.
- Holecek J, Nadvorni, M, Handlir K, Lycka, A. *J. Organomet. Chem.* 1983; **241**: 177.
- Haward Jr. G. Creceley RW, Nelson WH. *Inorg. Chem.* 1985; **24**: 2204.
- Smith PJ, Tupeiauskas AP. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* 1978; **8**: 291.
- Ng SW, Wei C, Kumar Das VG, Mak, TC. W. *J. Organomet. Chem.* 1987; **334**: 295.
- Bondi, A. *J. Phys. Chem.* 1964; **68**: 441.
- Davies AG, Milledge HJ, and Puxley DC. *J. Chem. Soc. A* 1970; 2862.
- Lockhart TP. *Organometallic* 1988; **7**: 1438.
- Lockhart TP, Davidson F. *Organometallic* 1987; **6**: 2471.
- Shier WT, Mammalian cell culture on \$5 a day: a laboratory manual of low cost methods, los Banos, University of the Philippines 1991; 64pp.

Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Jati *Tectona grandis* dengan Cara Fermentasi

Yanty Maryanty¹⁾, F. Madayanti²⁾, Akhmaloka²⁾

¹⁾ Program Studi S2 Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
yantychotob@yahoo.com

²⁾ Staf Pengajar Biokimia Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
fida@chem.itb.ac.id

²⁾ Staf Pengajar Biokimia Departemen Kimia FMIPA, Institut Teknologi Bandung
loka@chem.itb.ac.id

Abstrak

Flavonoid adalah komponen fenolik dengan berat molekul rendah yang secara luas terdapat pada tumbuhan, umumnya pada tumbuhan tingkat tinggi. Flavonoid bermanfaat bagi kesehatan manusia. Flavonoid diketahui secara *in vitro* berpotensi sebagai antioksidan dan pemecah aktivitas radikal bebas. Fakta-fakta yang berkembang flavonoid berperan melindungi dari penyakit kardiovaskular dan kanker. Beberapa flavonoid mempunyai sifat sebagai antiviral, antibakterial, antifungal atau anti-alergenik. Pada umumnya untuk mendapatkan senyawa flavonoid dari tumbuhan digunakan metoda ekstraksi dengan berbagai jenis pelarut kimia, dalam penelitian ini ditujukan untuk menemukan metoda lain dalam mengisolasi senyawa flavonoid dari daun jati *Tectona grandis* melalui proses fermentasi dengan mikroorganisme *Aspergillus niger*. Hasil adaptasi *Aspergillus niger* pada media 100% daun jati *Tectona grandis*, umur inokulum yang dapat digunakan untuk proses fermentasi dengan skala yang lebih besar adalah 48 jam dimana yield yang dihasilkan 2,05% pada kondisi pH rata-rata 3,75. sedangkan yield flavonoid yang dihasilkan dengan cara ekstraksi soxletasi 1,27%. dengan peningkatan efisiensi sebesar 61,85% pada proses fermentasi.

Kata kunci: Flavonoid, fermentasi *Aspergillus niger*.

1. Pendahuluan

Flavonoid adalah komponen fenolik dengan berat molekul rendah yang secara luas terdapat pada tumbuhan, umumnya pada tumbuhan tingkat tinggi (Harborne & Williams 2000). Komponen-komponen flavonoid umumnya berupa pigmen tumbuhan, tetapi juga berupa komponen yang terlibat dalam beberapa interaksi secara biologi. Flavonoid dibangun dari rantai flavon C₆-C₃-C₆ dimana jembatan C₃ antara gugus fenil umumnya berbentuk siklik dengan oksigen. Berdasarkan pada derajat ketidak jenuhan dan oksidasi bagian C₃, flavonoid dibagi dalam beberapa kelas diantaranya isoflavan, antosianin, flavan (flavan-3-ol/ katekin), flavonol, flavon, dan flavanon.. kebanyakan flavonoid berupa glikosida yang jumlah aglikon flavonoid relatif

sedikit, yang secara umum larut dalam air dan terakumulasi dalam vakuola sel tumbuhan. (Alan Miller)

Flavonoid bermanfaat bagi kesehatan manusia. Flavonoid diketahui secara *in vitro* berpotensi sebagai antioksidan dan pemecah aktivitas radikal bebas. Fakta-fakta yang berkembang flavonoid berperan melindungi dari penyakit kardiovaskular dan kanker. Beberapa flavonoid mempunyai sifat sebagai antiviral, antibakterial, antifungal atau anti-alergenik. meskipun begitu, karena berbagai bentuk flavonoid yang tersebar luas, interaksi yang memungkinkan dengan senyawa lain, dan metabolisme yang kompleks dalam sistem manusia, penelitian untuk hal ini masih sangat dibutuhkan. (Robert J Nijveldt, dkk)

Kandungan kimia yang terdapat pada Jati emas diantaranya: Tanin dan lendir (kandungan aktif utama yang berhubungan dengan aktivitas pelangsing tubuh/ “*body slimming*”), alkaloid, β - sitosterol, kafein, friedelin - 3α - asetat, friedelin - 3β - ol, terpens/sterol, karotenoid, flavonoid, resin, glukosa, asam lemak, asam fenolik, zat-zat pahit dan karbohidrat dalam lendir (Rantee group, inc). Pada umumnya untuk mendapatkan senyawa flavonoid dari tumbuhan digunakan metoda ekstraksi dengan berbagai jenis pelarut kimia, dalam penelitian ini ditujukan untuk menemukan metoda lain dalam mengisolasi senyawa flavonoid dari daun jati *Tectona grandis* melalui proses fermentasi yang merupakan salah satu bagian bioteknologi yang menggunakan mikroorganisme sebagai pemeran utama dalam suatu proses (srikandi fardiaz) dalam hal ini mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus niger* karena dapat menghasilkan berbagai enzim diantaranya hidrolase, α -amilase, amilase, N-araginase, katalase, selulase, enzim selulolitik, glukose oksidase, glukoamilase, maltase dan protease, yang diharapkan dapat mengoptimalkan senyawa flavonoid yang dihasilkan.

2. Percobaan

2.1 Bahan Baku

Bahan baku penelitian adalah daun jati emas yang diperoleh dari daerah Karawaci Tanggerang. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus niger*, yang diperoleh dari laboratorium Bioprosess Departemen Teknik Kimia ITB.

2.2 Penyiapan Sampel Basah

Daun jati dicuci bersih dengan menggunakan air dan dibilas dengan aquades, dan dikeringkan dalam suhu ruang. Daun yang telah dikeringkan kemudian dibelnder dengan perbandingan daun dan aquades 1: 5 sampai terbentuk *slurry* daun jati. *Slurry* daun jati dituangkan kedalam Erlenmeyer selanjutnya media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf. (Delita Yuliani)

2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kedalam medium adaptasi diinokulasi secara aseptik sebanyak 10% (V/V) inokulum spora dari jamur *Aspergillus niger*, kemudian inkubasi selama 72 jam pada suhu ruang 23-27°C dengan pengocokan 180 rpm. Selama inkubasi tersebut dilakukan sampling setiap

intervalwaktu 12 jam. Pada setiap sampling tersebut dilakukan pengukuran berat kering dari jamur dan pH. Kemudian dibuat grafik antara berat kering, yang telah dikoreksi terhadap kontrol berupa medium yang tidak diinokulasi dengan jamur pada kondisi yang sama dengan asumsi hanya berat miselium yang terukur, terhadap waktu. Dari aluran kurva pada medium adaptasi diperoleh umur optimum jamur (spora). Dari grafik juga dapat ditentukan yield dan rendemen flavonoidnya.(Delita Yuliani)

2.4 Ekstraksi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Jati

Daun jati dicuci dan dikeringkan pada suhu 35°C dalam oven dan dengan liquidizer diubah dalam bentuk bubuk. Bubuk daun jati diekstraksi dengan menggunakan dietileter secara soxhletasi selama 4 jam untuk menghilangkan kandungan lemaknya, kemudian daun di saring menggunakan kertas saring whatman no.1 secara vakum. Bubuk daun jati kering selanjutnya diekstraksi dua kali dengan menggunakan pelarut methanol . ekstrak yang mengandung flavonoid disaring dengan menggunakan kertas whatman no.1 secara vakum dan diuapkan dengan menggunakan rotavapor. Ekstrak dikeringkan pada suhu 35-40°C dengan udara panas.(Rita Spiteri)

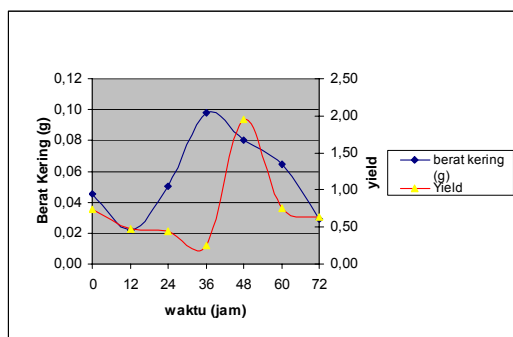
3. Hasil Dan Pembahasan

Pertumbuhan pada organisme uniseluler (ber sel tunggal) adalah penambahan jumlah sel yang berarti juga penambahan jumlah mikroorganisme. dalam fermentasi biasanya dilakukan pengukuran jumlah mikroorganisme untuk mengetahui kecepatan pertumbuhannya dilakukan dengan beberapa cara seperti pengukuran jumlah sel (perhitungan mikroskopik langsung, hitung cawan), pengukuran massa sel (pengukuran berat kering, kekeruhan), pendugaan massa sel secara tidak langsung (pengukuran konsumsi nutrient, pengukuran komponen sel)(Srikandi Fardiaz). pada penelitian ini pengukuran pertumbuhan *Aspergillus niger* dengan pengukuran berat kering selnya. dari hasil percobaan terlihat terjadi penurunan jumlah mikroba pada awal fase adaptasinya (Tabel 1) pada jam ke-0 sampai jam ke-12 dan diikuti fase logaritmik hingga jam ke-36. dengan interval waktun pengukuran 12 jam fase statis tidak terlihat dalam grafik sehingga dari fase logaritmik langsung diikuti

Tabel 1 Korelasi waktu terhadap pH

WAKTU (JAM)	pH			
	K	A	B	RATA-RATA
0	5	4.5	4.5	4.5
12	5	4.5	4.5	4.5
24	5	4.5	4.5	4.5
36	5	4	4	4
48	5	4	3.5	3.75
60	5	3	3	3
72	5	3	3	3

Keterangan: K: Kontrol; A: sampel A; B: sampel B



Gambar 1 berat kering dan yield terhadap waktu

dengan fase menuju kematian pada jam ke-48 dan fase kematian pada jam ke-72.

Flavonoid merupakan metabolit sekunder, dimana komponen ini tidak diproduksi pada waktu pertumbuhan sel secara cepat (fase *logaritmik* atau fase *drophase*) (Srikandi Fardiaz), pada gambar 1 bahwa flavonoid diproduksi dengan hasil yang tertinggi pada waktu adaptasi jam ke-48, dimana kondisi ini dapat dipergunakan untuk produksi flavonoid pada skala yang lebih besar. Kebanyakan mikroba dapat tumbuh pada kisaran pH 3-4 unit pH atau kisaran 1000 – 10.000 konsentrasi ion hidrogen. nilai pH untuk pertumbuhan mikroba mempunyai hubungan dengan suhu pertumbuhannya. jika Selama proses fermentasi kemungkinan terjadi perubahan senyawa kimia diantaranya polifenol dan gula. Perubahan ini dibantu oleh enzim yang dapat menguraikan senyawa polifenol menjadi antosianin dan perubahan gula menjadi alkohol

yang selanjutnya alkohol tersebut dipecah menjadi asam-asam organik sehingga menyebabkan penurunan derajat keasaman (pH) selama proses fermentasi. Hal ini dapat dilihat pada tabel 1 untuk kontrol harga pH tetap sedangkan pada sampel terjadi penurunan pH mencapai pH 3 diakhir proses fermentasi. pertumbuhan naik, pH optimum untuk pertumbuhannya juga naik. dalam fermentasi, kontrol pH penting sekali dilakukan karena pH yang optimum harus dipertahankan selama proses berlangsung. Pada penelitian ini kondisi pH rata-rata yang dicapai pada jam ke-48 pada pH 3,75. (Tabel 1) (Srikandi Fardiaz)

Flavonoid yang dihasilkan dengan proses soxletasi sebesar 14 g dengan berat daun basah 96 g yield yang dihasilkan 1,21 %. Jika dikonversi dalam berat daun basah sebesar 8.33 g seperti yang digunakan dalam proses fermentasi maka Yield yang didapat 1,27 % . jumlah ini lebih kecil jika dibandingkan dengan proses fermentasi sel bebas sehingga pada proses fermentasi terjadi efisiensi sebesar 61, 85% dibandingkan dengan proses ekstraksi.

4. Daftar Pustaka

1. Fardiaz Srikandi, 1989. Fisiologi Fermentasi . Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IUC FN IPB.
2. Harborne J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Edisi Kedua. Pebnerbit ITB. Bandung
3. Miller Alan L, ND. 2004. Antioksidan Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. <http://www.thorne.com/altmedrev/fulltext/flavonoids1-2.html>, Diakses tanggal 2 Juni 2004.
4. Nijveldt J Robert. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanism of Action And Potential Applications. Am J Clin Nutr; 74: 418-25
5. Rantree Group, Inc. (1996-1997). Mutamba – Guazuma ulmifolia [online]. Available WWW: <http://www.rain-tree.com>, Diakses tanggal 28 April 2004.
6. Spiteri Rita: Analysis of Rutin: A Flavonoid Found in *Capparis Spinosa L*. Available http://www.cis.um.edu.mt/~phcy/symp98/Rita_Spiteri.html. Diakses tanggal 10 September 2004

Interfacial Adsorptions of Metal (II/III) Complexes of 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol by the High-Speed Stirring Spectrophotometry

Yoki Yulizar¹⁾ dan Hitoshi Watarai²⁾

¹⁾Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia
e-mail: yokiy@ui.edu

²⁾Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan
e-mail: watarai@chem.sci.osaka-u.ac.jp

Abstract

Interfacial adsorptions of divalent and trivalent metal(II/III) complexes of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol were investigated in toluene-water and heptane-water systems by the high-speed stirring method combined with a photodiode-array spectrophotometry, (metal ion = Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Dy(III) and Gd(III)). The observed all-metal complexes were completely adsorbed at the liquid-liquid interfaces, except for Cu(II) complex dissolved in aqueous phase, and a large number of Ni(II) and Zn(II) complexes would be extracted in the toluene. However, Ni(II) and Zn(II) complex at the toluene-water interface were adsorbed higher than the ligand. The analysis of the interfacial adsorption constants of ligand and complex were determined by the Langmuir adsorption isotherm.

Key words: *Complexation, interfacial adsorption, liquid-liquid interface, solvent extraction, pyridylazo ligand.*

1. Introduction

The interfacial adsorptions have been studied by the stirring cell system, the interfacial tension measurement, and the electrochemical method (Hanna and Noble, 1985). Growing attention to study of the solvent extraction kinetics requires increasingly more convenient apparatus for the extraction rate measurements. For this purpose, the high-speed stirring (HSS) method has been developed and applied for the interfacial measurement in solvent extraction kinetics (Watarai, 1986). The HSS apparatus installed with a photodiode array detector, which made possible a rapid acquisition of the organic phase spectra, simultaneous calculation of the initial extraction rate and the interfacial concentration of the species. The advantages of this method are reliable for the measurement of the interfacial adsorption and the extraction rate of a diluted species in organic phase or in

aqueous phase with a high accuracy, even in liquid-liquid dispersions generated by vigorous stirring. It is quite easy to detect a weak interfacial adsorption as low as 0.1% in much lower concentration before an interfacial saturation, which is difficult by usual interfacial tension measurements (Watarai, 1997).

Because the investigation of adsorption behavior of ligand and metal complex at the interface are very important to understand the roles of interface in the kinetic mechanisms in the liquid-liquid systems, therefore in this paper, we performed the measurement of the interfacial adsorption of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP) ligand and its metal complexes (first transition metal ion: Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), and lanthanoide ion: Dy(III), Gd(III)), as well as measurement of the interfacial complex formation in the extraction systems in

the toluene-water and heptane-water interface by the HSS spectrophotometry.

2. Experimental

2.1 Reagents

Heptane and toluene (Nacalai Tesque Inc., G.R.) were purified by fractional distillation. 5-Br-PADAP (Dojindo lab., G.R.) was dissolved in heptane or toluene. The pH of aqueous phase was controlled with acetate buffer or by the mixture of MES (Dojindo) and NaOH. The ionic strength of the aqueous phase was maintained at 0.1 M by $(\text{H}^+, \text{Na}^+) \text{ClO}_4^-$. Ni powder (>99.99% purity), Co metal (99.9%), Cu metal (99.999%), Zn metal (>99.98%), Dy_2O_3 and Gd_2O_3 and all the reagents were of analytical reagent grade. Water was purified by using a Milli-Q system (Millipore) after distillation and deionization.

2.2 High-speed stirring measurement

The measurements of interfacial adsorption of ligand and metal complex, and the extraction process of metal(II/III) with 5-Br-PADAP in liquid-liquid systems were performed by the high-speed stirring (HSS) spectrophotometry, analogous to that reported previously (Onoe, 1998; Watarai, 1995). 49.5 ml of a buffered aqueous phase without metal (II/III) containing 0.1 M $(\text{H}^+, \text{Na}^+) \text{ClO}_4^-$ and 50 ml of HL in toluene or heptane were put into the glass stir cell, immersed in a thermostated water bath at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, and stirred at the rate of 5000 rpm.

The organic phase was continuously separated from the agitated mixture by means of a PTFE phase separator and circulated through a flow cell with 10 mm optical path length installed in a Shimadzu photodiode-array detector SPD-M 6A at a flow rate of 15 ml min^{-1} . Before the addition of metal(II/III) solution, the interfacial adsorption behaviour of ligand was observed at 5000 rpm. When the stirring speed was decreased to 200 rpm, the absorbance increase of ligand in organic phase was observed. Afterward, 0.5 ml metal(II/III) stock solution was injected into the mixture at 5000 rpm, and the metal complexation was initiated. The absorption spectra of the organic phase were observed as a function of time.

The powders of Ni(II) and Zn(II) complexes were synthesized by the technique of the interfacial liquid-liquid reaction. They were dissolved in toluene to prepare the stock solutions, and used for the determination of the interfacial adsorption constants of metal complexes in the toluene-water system by the HSS method.

3. Results and Discussion

3.1. Interfacial adsorption of ligand

Figure 1a shows the interfacial adsorption measurement of ligand in the toluene-water system observed at the absorption maximum wavelength, $\lambda_{\text{max}} = 462 \text{ nm}$. First, the rate of stirring is conducted under a high speed (5000

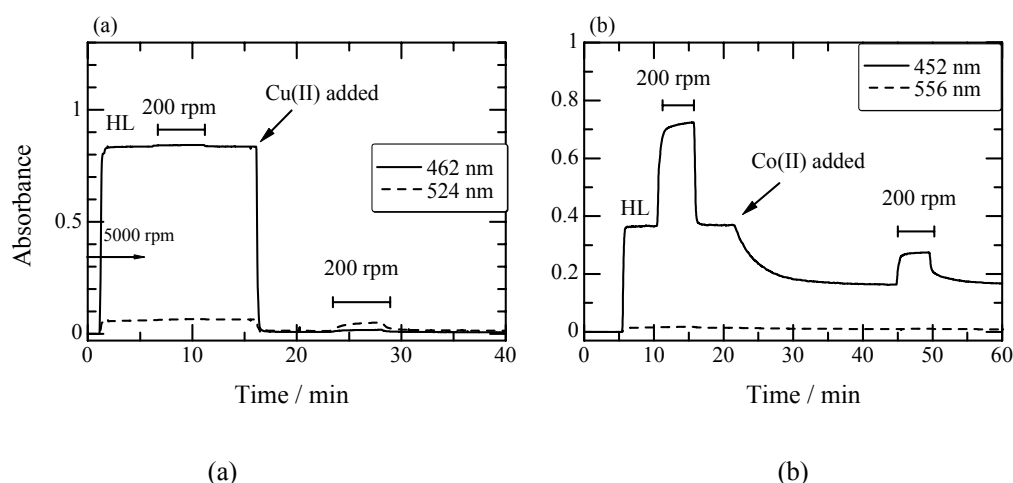


Fig. 1. Typical absorbance changes of Cu(II) complexation in toluene-water system (a), and Co(II) complexation in heptane-water system (b) versus extraction time were observed at 200 rpm and 5000 rpm by the high-speed stirring method; (a) $[\text{HL}] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Cu(II)}] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, pH 6.5, (b) $[\text{HL}] = 1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Co(II)}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 6.0.

rpm) and the dispersed mixture contains HL. The rate of stirring was changed to 200 rpm (low speed), and the concentration of ligand in the organic phase slightly increased due to the decrease in the interfacial area. In this system, the concentration of ligand was adsorbed very small at the interface. The amount of interfacial species, n_i (mol) was calculated by,

$$n_i = [\text{HL}]_i S_i = \frac{(A_{200} - A_{5000}) V_o}{\epsilon l} \quad (1)$$

where $[\text{HL}]_i$ is the interfacial concentration of the species (mol cm^{-2}), S_i the interfacial area ($17,000 \text{ cm}^2$), A_{200} and A_{5000} are the absorbances in the organic phase under the low speed stirring and the high speed stirring conditions, respectively. V_o , ϵ and l are the volume of the organic phase (50 cm^3), molar absorptivity ($4.19 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 462 nm in toluene), and the optical path length of the flow cell (1 cm). Interfacial adsorption constant, K' in a dilute concentration of HL is defined as

$$K' = \frac{[\text{HL}]_i}{[\text{HL}]_o} \quad (2)$$

where $[\text{HL}]_o$ and $[\text{HL}]_i$ is the concentrations of HL in the organic phase and at the interface, respectively. From the Eq. (1), the value of $[\text{HL}]$ at the interface was obtained as $6.68 \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$ under the initial bulk phase concentration of $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ HL, therefore K' value of ligand was calculated as $3.34 \times 10^{-5} \text{ cm}$.

Fig. 1. Typical absorbance changes of Cu(II) complexation in toluene-water system (a), and Co(II) complexation in heptane-water system (b) versa extraction time were observed at 200 rpm and 5000 rpm by the high-speed stirring method; (a) $[\text{HL}] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Cu(II)}] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, pH 6.5, (b) $[\text{HL}] = 1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Co(II)}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, pH 6.0.

Figure 1b shows the interfacial adsorption measurement of ligand in the heptane-water system prior to the addition of metal ion. The absorbance change of ligand was observed at the $\lambda_{\text{max}} = 452 \text{ nm}$ under the high-speed stirring. At the equilibrium state, the stirring speed was decreased quickly until 200 rpm, and then the subsequent recovery of the absorbance was observed. From the change of absorbance and use the molar absorptivity in heptane at 452 nm ($5.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), the interfacial adsorption constant of HL was determined. The value of

$K'S_i$ was obtained from the fitting of the Langmuir adsorption isotherm to be $4.4 \times 10^1 \text{ cm}^3$. Using $aS_i = 8.7 \times 10^{-7} \text{ mol}$ for rhodamine B determined in toluene-water system, a is the maximum interfacial concentration of rhodamine B at the saturation state, which $\log a = -10.29 \text{ mol cm}^{-2}$ (Watarai, 1996). Therefore, the K' value was obtained to be $2.6 \times 10^{-3} \text{ cm}$ for ligand at heptane-water interface. The interfacial adsorption constants are very important to measure the kinetic reaction in the extraction system or that was formed completely at the interface.

3.2. Interfacial complexation

In Fig. 1b, after the observation of the interfacial adsorption behaviour of the ligand in the heptane-water system, Co(II) ion was added into the dispersed mixture and caused a decrease of HL (452 nm), but no extraction of the complex into the heptane phase (556 nm). This phenomenon suggested that the complexation took place at the interface, and was adsorbed at the interface completely. The same results were observed also for the other metal ions: Dy(III) and Gd(III) complexes both in the toluene-water and heptane water systems, except for Cu(II) complex that can dissolve in the aqueous phase. In the case of Ni(II) complex in the heptane-water system, it would be adsorbed at the interface completely when the condition interfacial area was high by the increase of the stirring rate (5000 rpm), however if the stirring rate was decreased to 200 rpm, a part of Ni complex would be extracted in the heptane phase. While, Zn(II) complex in the heptane-water system, and Co(II), Dy(III), Gd(III) complexes both in the toluene-water and heptane water systems were still adsorbed at the interface completely, although the interfacial area was decreased drastically to 200 rpm.

3.3. Interfacial adsorption of metal complexes

Absorbance changes as a function of time in the interfacial adsorption of Zn(II) complex in the toluene-water system was shown in Fig. 2. When the initial concentration of Zn(II) complex in the range of $2.9 \times 10^{-7} - 7.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ in toluene, and aqueous buffer solution without metal ion (pH 10.1) in glass stir-cell were highly stirred (5000 rpm), the adsorption of complex at the interface was observed very fast, on the contrary when the stirring speed

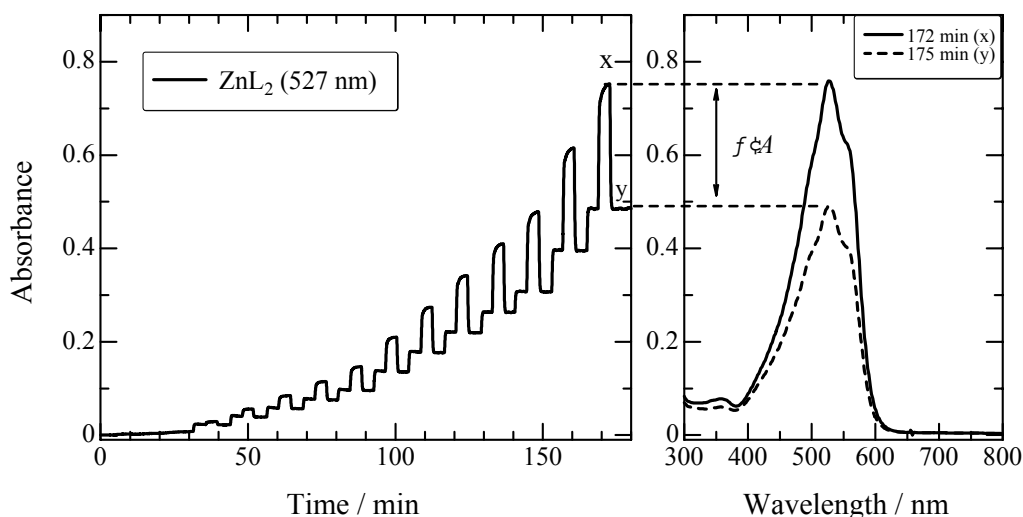


Fig. 2. (a) Interfacial adsorption of Zn(II) complex in toluene-water system was shown by the absorbance change against the function of time. (b) The absorption spectra of Zn(II) complex were observed when the low-speed stirring (200 rpm) at 172 min (solid line) and when the high-speed stirring (5000 rpm) at 175 min (dashed line). The absorption maximum wavelength of Zn(II) complex in toluene, $\lambda_{\max} = 527$ nm. $[\text{Zn(II)-complex}] = 9.8 \times 10^{-7} - 7.6 \times 10^{-6}$ M in toluene, and aqueous buffer solution without metal ion (pH 10.1).

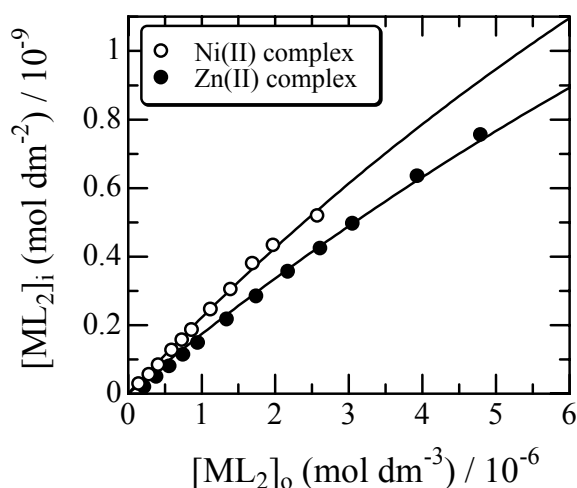


Fig. 3. Interfacial adsorptions of Zn(II) complex (black circle) and Ni(II) complex (white circle) in toluene-water system showed the good fitting with those were calculated by the Eq. (5) of Langmuir interfacial adsorption.

was decreased to 200 rpm, it caused the fast desorption of complex from the interface into the organic phase. The difference of absorbance (ΔA) of the complex at $\lambda_{\max} = 527$ nm between both the stirring state was used to calculate the concentration of metal complex at the interface, $[\text{ZnL}_2]_i$,

$$[\text{ML}_2]_i = \frac{\Delta A}{\epsilon l S_i / V_o} \quad (3)$$

While A' as the absorbance under the high-speed stirring was used to calculate the concentration of complex in the organic phase, $[\text{ZnL}_2]_o$,

$$[\text{ML}_2]_o = \frac{A'}{\epsilon l} \quad (4)$$

where the value of ϵ for ZnL_2 in toluene at 527 nm = $1.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ [Yulizar et al., 2000].

Figure 3 shows the dependence of the interfacial complex concentrations (mol dm^{-2}) against the concentration of complex in organic phase (mol dm^{-3}). It showed a good fitting after analyzing by an equation of the Langmuir adsorption isotherm below,

$$[\text{ML}_2]_i = \frac{aK'[\text{ML}_2]_o}{a + K'[\text{ML}_2]_o} \quad (5)$$

Using the value of $\log (a/\text{mol dm}^{-2}) = -8.29$, we obtained the value of adsorption constant, K' of Zn(II) complex at the toluene-water interface as $1.80 \times 10^{-4} \text{ dm}$. The Ni(II) complex showed also the phenomenon of Langmuir interfacial adsorption as shown in Fig. 3. The initial concentrations of Ni(II) complex in the toluene were in the range of $2.4 \times 10^{-7} - 4.3 \times 10^{-6} \text{ M}$. The calculation of K' for NiL_2 at the interface was conducted by the similar way as ZnL_2 using the Eq. (3-5), which ε for NiL_2 in toluene at 524 nm is $9.97 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ dm}^{-1}$ and K' at pH 6.0 was obtained to be $2.32 \times 10^{-4} \text{ dm}$. The results proved that although the ligand was a slightly adsorbed at the toluene-water interface, however the formed Zn(II) and Ni(II) complexes would be adsorbed at the interface remarkable stronger than ligand under the high-speed stirring.

4. Conclusion

The adsorption behavior of 5-Br-PADAP ligand and Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Dy(III) and Gd(III) complexes were investigated at the toluene-water and heptane-water interface by the high-speed stirring method. The entire of the observed metal complexes were adsorbed at the interface completely, except for Cu(II) complex that dissolved in the aqueous phase, and Ni(II) and Zn(II) complexes were extracted in the toluene.

From the results, we obtained the values of the interfacial adsorption constant of the ligand and the complex those were very important to calculate the kinetic measurement of the interfacial complex formation in the extraction system. Considering interfacial adsorption behavior of complex, we also could understand

the role the interface in the different solvents and the various of metal systems to investigate the aggregate formation of the complex.

5. Acknowledgments

This work was financially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 12304045) and a Scientific Research of Priority Area (No. 13129204) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan.

6. References

- Hanna G.J. and Noble R.D., (1985). Measurement of Liquid-Liquid Interfacial Kinetics, *Chem. Rev.*, **85**, 583-598.
- Onoe Y., Tsukahara S., Watarai H., (1998). Catalytic Effect of N,N-Dimethyl-4-(2-Pyridylazo)aniline on the Extraction Rate of Ni(II) with 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol: Ligand-Substitution Mechanism at the Liquid-Liquid Interface, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 603-608.
- Watarai H. and Funaki F., (1996). Total Internal Reflection Fluorescence Measurements of Protonation Equilibria of Rhodamine B and Octadecylrhodamine B at a Toluene/Water Interface, *Langmuir*, **12**, 6717-6720.
- Watarai H., Gotoh M., Gotoh N., (1997). Interfacial Mechanism in the Extraction Kinetics of Ni(II) with 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and Molecular Dynamics Simulation of Interfacial Reactivity of the Ligand, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 957-964.
- Watarai H., Sasaki K., Takahashi K., Murakami J., (1995). Interfacial Reaction in the Synergistic Extraction Rate of Ni(II) with Dithizone and 1,10-Phenanthroline, *Talanta*, **42**, 1691-1700.
- Watarai H., Takahashi M., Shibata K., (1986). Interfacial Phenomena in the Extraction Kinetics of Nickel(II) with 2'-Hydroxy-5'-nonylacetophenone Oxime, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 3469-3473.
- Yulizar Y., Ohashi A., Nagatani H., Watarai H., (2000). Kinetic Study of Ni(II) and Zn(II) Complexation with a Pyridylazo Extractant by a Centrifugal Liquid Membrane Method, *Anal. Chim. Acta*, **419**, 107-114

Identifikasi korban musibah massal menggunakan sistem klasifikasi HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia

Yoni F. Syukriani^{1,2,3)}, Merlyn Surja^{2,3)}, Endang S. Atimah³⁾, A. S. Noer^{2,3)}

- ¹⁾ Bagian Ilmu Kedokteran Forensik, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran,
Jl. Pasirkaliki no. 190, Bandung 40161, Indonesia
e-mail: yoni_f@forensik.fkup.ac.id
- ²⁾ Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia
- ³⁾ KPP Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia

Abstrak

Identifikasi korban musibah massal menggunakan urutan nukleotida Hypervariable Segment I nt 16024-16364 DNA mitokondria (HVSI mtDNA) manusia telah mulai banyak dilakukan. Beberapa database urutan nukleotida HVSI mtDNA yang disusun oleh berbagai kelompok peneliti telah digunakan pula untuk mendukung proses identifikasi. Database yang ada saat ini disusun oleh kelompok-kelompok dengan tujuan dan konsep yang berbeda-beda, sehingga potensi database yang besar ini tidak dapat dimanfaatkan secara optimal untuk mendukung proses identifikasi. Identifikasi dengan membandingkan urutan nukleotida pun sulit dilakukan jika jumlah sampel yang harus diidentifikasi banyak, seperti pada musibah massal. Dalam makalah ini kami melaporkan hasil identifikasi korban massal menggunakan sistem klasifikasi HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia ditunjang database gabungan HVSI mtDNA. Database gabungan adalah kumpulan data urutan nukleotida HVSI mtDNA manusia dari berbagai database yang formatnya telah disamakan. Seluruh data diklasifikasikan berdasarkan jumlah dan jenis perbedaan dengan standar urutan nukleotida mtDNA Cambridge. Urutan nukleotida HVSI mtDNA para korban dan pembanding kemudian dibandingkan. Jika profil HVSI korban sama dengan pembanding sehingga kemungkinan berasal dari garis keturunan ibu yang sama, data harus dibandingkan dahulu dengan database gabungan untuk mencari berapa orang yang memiliki profil sama. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sistem ini mempercepat proses dan mempertajam spesifisitas identifikasi korban massal, khususnya jika asal suku bangsa korban sulit diperkirakan. Sistem ini telah digunakan dalam proses identifikasi korban bom Jakarta, 12 September 2004 dan dicobakan untuk rekonfirmasi identifikasi korban bom Bali, 12 Oktober 2002.

Kata kunci: HVSI, identifikasi, mtDNA, musibah massal.

Mass disaster victim identification employing mtDNA HVSI nt 16024-16363 classification system

Abstract popular

Mass disaster victim identification using nucleotide sequences of Hypervariable Segment I nt 16024-16364 human mitochondrial DNA (mtDNA HVSI) has been widely accepted. Several different mtDNA HVSI databases, which were developed by different groups with different system and comprise various populations have been used to support identification process. Combining the large amount of data in a single database would optimize the use, including in

mass disaster victims identification, especially when the victims are suspected originated from different population. Here we report the identification of mass disaster victim employing mtDNA HVSI nt16024-16364 classification system, supported by combined HVSI databases. HVSI nucleotide sequence data from a variety of databases were accumulated, converted into the same format, and classified into groups based on the type and the amount of differences compared to Cambridge sequence. If HVSI sequence of the victim is identical with a reference they cannot be excluded originated from people who shared the same maternal lineage; in that case the identification is supported by counting the identical profile in the combined database. This method accelerates identification process and improves its specificity in mass victims identification, particularly when the victim's population cannot be ascertain. The method has been used in the identification of September 12th 2004 Jakarta bomb blast victims and in reconfirmation of October 12th 2002 Bali bomb blast victims identification.

Keywords: HVSI, identification, mass victim, mtDNA.

1. Pendahuluan

Genom DNA mitokondria (mtDNA) manusia berbentuk sirkuler dengan panjang 16.569 pb (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1991), terdiri atas daerah pengode yang relatif *conserved*, dan daerah bukan pengode yang bersifat *hypervariable* (Hochmeister, 1995). Di dalam setiap sel terdapat banyak molekul mtDNA yang identik (Allen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1995), yang menyebabkan kemungkinan untuk mendapat DNA dari bahan pemeriksaan yang telah mengalami degradasi lebih tinggi dibandingkan DNA inti. Identifikasi urutan nukleotida mtDNA telah divalidasi untuk identifikasi sampel forensik berupa gigi (Holland *et al.*, 1993), tulang dan rambut tanpa akar (Boles *et al.*, 1994; Jehaes *et al.*, 1998).

Identifikasi korban musibah massal menggunakan analisis D-loop mtDNA dianggap memiliki nilai lebih, khususnya untuk memeriksa bahan pemeriksaan yang telah terbakar, membusuk, atau jika pembanding yang ada dari garis keturunan ibu (Boles *et al.*, 1994; Syukriani, *et al.*, 2003). Identifikasi menggunakan mtDNA dilakukan dengan cara membandingkan urutan nukleotida mtDNA sampel dengan pembanding. Jika profil mtDNA korban tidak dapat disingkirkan berasal dari orang yang sama atau dari keluarga satu garis keturunan ibu maka biasanya akan dicari informasi menyangkut nilai bukti (*weight of the evidence*), yaitu membandingkan profil tersebut dengan data urutan nukleotida dalam populasi. Dewasa ini, caranya adalah dengan menghitung jumlah orang yang memiliki profil yang sama dalam populasi (Bar *et al.*, 2000; Holland & Parsons, 1998). Kendala jumlah bahan pemeriksaan yang sangat banyak pada musibah massal telah dicoba untuk diatasi

dengan menggunakan *software phylogenetic tree* (Syukriani, *et al.*, 2003).

Namun demikian, tidak setiap bangsa telah memiliki data populasi yang memadai, selain itu pada banyak kasus asal populasi korban yang hendak diidentifikasi belum jelas, misalnya musibah massal pada daerah-daerah wisata atau kota megapolitan yang banyak dikunjungi orang dari berbagai suku bangsa dan ras (Syukriani *et al.*, 2003). Untuk kasus serupa itu maka perlu digunakan *database* urutan nukleotida mtDNA yang dikumpulkan dari berbagai asal suku bangsa dan ras dengan sistem klasifikasi genetik tanpa melihat asal suku bangsa dan ras bersangkutan (Merlyn *et al.*, 2005; Noer *et al.*, 2005). Dalam makalah ini akan diuraikan hasil identifikasi kasus korban musibah massal bom Kuningan 12 September 2004, menggunakan sistem klasifikasi HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia yang didasarkan pada jumlah dan jenis perbedaan nukleotida dengan standar urutan mtDNA Cambridge (Merlyn *et al.*, 2005) yang bertujuan mempercepat proses serta mempertinggi derajat keyakinan identifikasi (*specificity*). Metode ini dicobakan pula dalam rekonfirmasi hasil identifikasi korban kasus musibah massal bom Bali 12 Oktober 2002, yang sebelumnya telah dilakukan dengan metode berbeda (Syukriani *et al.*, 2003).

Kasus Musibah Massal

Kasus musibah massal ledakan bom di Jakarta, 12 September 2004 (Kasus I) menewaskan puluhan orang, dan sebagian jenazah korban dalam keadaan hancur, sehingga sulit diketahui dengan pasti berapa orang jumlah korban sebenarnya. Dikarenakan lokasi terjadinya ledakan adalah di depan kantor kedutaan besar asing, maka asal suku bangsa sebagian korban

yang jenazahnya rusak juga diperkirakan bermacam-macam.

Kasus kedua adalah musibah massal bom Bali, 12 Oktober 2002, yang menewaskan ratusan orang dengan banyak jenazah dalam keadaan hancur. Mengingat lokasi ledakan adalah tempat yang didatangi oleh wisatawan dari banyak negara, maka asal suku bangsa sebagian korban sulit diperkirakan.

2. Percobaan

Database HVSI mtDNA

Database dibuat dengan cara menggabungkan data urutan mtDNA manusia (nt 16024-16364) berbagai populasi dunia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) dan situs FBI (<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/miller1.htm>).

Pekerjaan Laboratorium

Pekerjaan laboratorium terdiri atas penyiapan templat yang akan diamplifikasi, amplifikasi PCR dan sekuensing.

Templat merupakan hasil lisis barang bukti biologis dari tempat kejadian, baik berupa otot atau rambut yang diperoleh secara *post mortem* dari jenazah korban tidak dikenal masing-masing sebanyak ~100 mg dipotong-potong sekecil mungkin secara steril. Bahan pemeriksaan pembanding berupa darah yang diambil dengan prosedur yang *lege artis*. Sampel darah (~50 µL) dan sampel lain didipigmentasi dengan 500 µL bufer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,5), divortex, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm 1' dan supernatan dibuang. Proses dilakukan beberapa kali (4-5 kali) hingga supernatan tampak bersih.

Pelet dilisis dengan 200 µL bufer lisis 1X [Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 1 mM pH 8,5; Tween 20 0,5% (v/v)], dan *proteinase* K dengan konsentrasi akhir 0,2 µg/µL (darah) atau 0,4 µg/µL (otot, rambut). Campuran diinkubasi dalam suhu 56°C 1 jam (darah) atau 1 malam (otot, rambut), kemudian diinaktivasi dalam suhu 95°C 10'. Hasil lisis disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit, dan supernatan berisi DNA digunakan sebagai templat PCR (modifikasi Noer *et al.*, 1994).

Seluruh reaksi amplifikasi PCR dilakukan dengan volume akhir 25 µl berisi 1 X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, and 0.001% gelatine), 0.2

mM dNTPs, 30 pmol setiap primer, 1 U *Taq DNA polymerase* dan 5 µl hasil lisis. Primer yang digunakan adalah HVSI *forward*: 5'-TGATTTCACG GAGGATGGTG -3' (nt 16401-16419) dan HVSII *reverse* : 5'-CACCATTAGC ACCCAAAGCT -3'(nt 15978-15998) (Noer *et al.*, 1994). Protokol temperatur reaksi: denaturasi 94°C 1', annealing 50°C 1', elongasi 72°C 1', sebanyak 30 siklus.

Sekuensing mtDNA

Produk PCR disekuensing menggunakan prosedur *dideoxy chain termination* (Sanger *et al.* 1977), yang dimodifikasi untuk DNA rantai ganda sesuai spesifikasi yang disarankan oleh produsen (Pharmacia-LKB, Swedia). Primer yang digunakan dalam reaksi sekuensing adalah primer yang juga digunakan dalam reaksi PCR. Proses sekuensing dilakukan menggunakan *automated analyzer* ABI Model 373A di Laboratorium Rekayasa Genetika-KPP Bioteknologi ITB.

Analisis data urutan nukleotida

Seluruh data urutan nukleotida hasil reaksi sekuensing diedit secara tersendiri, agar tidak ada kesalahan pembacaan nukleotida oleh *software* yang kadang-kadang terjadi. Masing-masing data diperiksa untuk dilihat perbedaan dengan urutan nukleotida standar Cambridge, sehingga setiap sampel memiliki keterangan mengenai profil jumlah nukleotida yang berbeda dengan standar dan pada posisi nukleotida mana perbedaan tersebut. Profil perbedaan jumlah dan jenis antara sampel dan pembanding dibandingkan. Jika terdapat sampel dan pembanding yang sama, maka analisis dilanjutkan dengan mencari profil tersebut dalam *database* gabungan dan jumlah orang yang terobservasi memiliki profil yang sama dihitung.

3. Hasil dan Pembahasan

Database gabungan

Jumlah keseluruhan data yang diambil dari kedua situs tersebut adalah 11.345 data. Data yang diperoleh dari situs GenBank adalah 400 data HVSI mtDNA, sedangkan data yang diperoleh dari situs FBI berupa urutan nukleotida daerah D-loop (HVSI dan HVSII) adalah 10945 yang terbagi kedalam dua kelompok data yaitu kelompok data forensik sebanyak 4839 data dan kelompok data publikasi sejumlah 6106 data. Dari jumlah

tersebut total data HVSI (nt 16024-16364) adalah 9454. Data urutan nukleotida yang diperoleh dari kedua sumber data tersebut terdiri atas beragam suku bangsa di dunia dan disusun dengan format berbasis *spreadsheet* (Syukriani *et al.*, 2004). Setiap haplotipe di dalam *database* terdapat catatan jumlah orang yang memiliki haplotipe tersebut. Data lengkap dapat diakses pada situs jaringan <http://research.chem.itb.ac.id/database/mtDNA> (menggunakan *password* yang dapat diperoleh dengan cara menghubungi kami).

Dalam dekade terakhir analisis urutan nukleotida mtDNA mengambil bagian penting dalam identifikasi forensik. Namun demikian, perkembangan metode analisisnya jauh tertinggal dengan metode analisis DNA inti, meskipun mtDNA memiliki karakter-karakter khusus yang penting bagi identifikasi: terdapat 1000-10000 kopi molekul dalam tiap sel (Cann *et al.*, 1987; Wallace, 1994; Elson *et al.*, 2001), tidak ada rekombinasi, dan diturunkan secara maternal (Cann *et al.*, 1987; Eyre-Walker, 1999). Laju mutasi mtDNA mencapai 1.7×10^{-8} , atau 10-17 kali lebih cepat dibanding DNA inti (Sigurgardottir *et al.*, 2000). Lebih jauh, urutan nukleotida mtDNA menunjukkan polimorfisme tinggi sebagai konsekuensi terkumpulnya mutasi (Stoneking, 1993; Wallace, 1995). Karakter ini yang mendasari konsep bahwa mtDNA memiliki kemampuan diskriminasi individu.

Mekanisme diturunkannya mtDNA melalui garis maternal sering dianggap sebagai titik lemah analisis mtDNA, karena mekanisme ini mengakibatkan kemungkinan ditemukannya

beberapa orang yang memiliki urutan mtDNA identik. Beberapa penelitian mengajukan kemungkinan ditemukannya dua individu yang tidak memiliki hubungan kekeluargaan yang dekat untuk memiliki mtDNA identik (Stoneking *et al.*, 1991). Namun, semuanya berdasarkan pada analisis RFLPs atau hanya daerah-daerah tertentu pada mtDNA, dan berdasarkan pada populasi-populasi tertentu saja (Macaulay *et al.*, 1999; Finnila *et al.*, 2000; Sajantila, 1996). Oleh karena itu, terdapat tantangan pemanfaatan analisis DNA untuk musibah massal, khususnya jika korban berasal dari berbagai macam ras, seperti halnya pengalaman kami dalam identifikasi korban musibah massal.

Identifikasi

Berikut ini adalah contoh hasil-hasil pemeriksaan sampel korban dan pembanding dari dua kasus musibah massal yang ditampilkan dalam bentuk tabel. Data yang ditampilkan hanya sebagian dan bertujuan sebagai contoh, sedangkan data sebenarnya berjumlah ratusan.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa profil HVSI korban A identik dengan profil HVSI pembanding G sehingga korban A tidak dapat disingkirkan berasal dari orang yang memiliki hubungan keluarga dari garis keturunan ibu. Profil A/G memiliki tiga perbedaan dengan urutan HVSI (nt 16024-16364) standar Cambridge, yaitu A(16182)C, A(16183)C, T(16189)C, dan profil tersebut tercatat dalam *database* dimiliki oleh 2 orang (Hispanik-Amerika) di antara 10.083 orang.

Tabel 1 Data Kasus I

Profil HVSI (nt 16024-16364)			
Sampel		Jumlah perbedaan	Jenis perbedaan
Korban	S1	3	A(16182)C, A(16183)C, T(16189)C
	S2	3	C(16223)T, C(16261)T, T(16362)C
	S3	3	C(16223)T, C(16261)T, T(16362)C
	S4	3	C(16223)T, A(16230)G, C(16292)T
Pembanding	P1	3	C(16223)T, C(16261)T, T(16362)C
	P2	3	A(16182)C, A(16183)C, T(16189)C

Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil identifikasi dapat dikelompokkan berdasarkan jumlah perbedaan dengan standar Cambridge. Data pembanding PP3 memiliki 6 perbedaan dengan HVSI standar Cambridge tidak perlu dibandingkan dengan seluruh sampel, hanya perlu dibandingkan dengan sampel SS5 dan SS11. Pembanding PP4 hanya perlu dibandingkan dengan SS1, SS2, SS10 dan SS14, dan PP5 hanya perlu dibandingkan dengan SS3, SS12, SS16 dan SS19. PP3 terbukti identik dengan SS5, dengan jumlah orang yang memiliki profil identik yang tercatat dalam *database* sebanyak 2 di antara 9454 orang. PP4 terbukti identik dengan SS6, dengan jumlah orang yang memiliki profil

identik yang tercatat dalam *database* sebanyak 1 di antara 9454 orang. PP5 terbukti identik dengan SS16, dengan jumlah orang yang memiliki profil identik yang tercatat dalam *database* sebanyak 0 di antara 9454 orang.

Identifikasi yang menggunakan sistem klasifikasi jumlah dan jenis perbedaan dengan standar Cambridge mungkin tidak terlihat terlalu bermakna untuk digunakan pada kasus-kasus tunggal yang melibatkan 1-2 pasang sampel saja. Namun demikian, sistem ini sangat bermanfaat jika identifikasi melibatkan puluhan serta ratusan sampel karena relatif cepat namun akurasi tetap dapat diandalkan. Penggunaan software yang mampu membuat *phylogenetic tree* yang tersusun dari seluruh

Tabel 2 Data kasus II
Profil HVSI (nt 16024-16364)

Sampel	Jumlah perbedaan	Jenis perbedaan
Korban	SS1	5 C(16192)T, C(16256)T, C(16270)T, C(16286)T, C(16320)T
	SS2	5 T(16126)C, A(16163)G, C(16186)T, T(16189)C, C(16294)T
	SS3	2 G(16129)A, C(16256)T
	SS4	4 G(16129)A, T(16140)C, C(16223)T, T(16271)C
	SS5	6 G(16145)A, A(16181)G, C(16192)T, C(16223)T, C(16291)T, T(16304)C
	SS6	0 -
	SS7	1 T(16304)C
	SS8	3 C(16234)T, G(16274)A, T(16337)C
	SS9	4 C(16069)T, T(16131)C, G(16310)A, T(16311)C
	SS10	5 C(16187)T, C(16223)T, C(16290)T, C(16296)T, G(16319)A
	SS11	6 T(16126)C, A(16163)G, C(16186)T, T(16189)C, C(16294)T, T(16325)C
	SS12	2 T(16172)C, T(16304)C
	SS13	3 T(16172)C, T(16304)C, T(16311)C
	SS14	5 G(16129)C, T(16172)C, C(16294)T, T(16304)C, A(16340)T
	SS15	1 A(16281)T
	SS16	2 C(16187)T, C(16223)T
	SS17	4 C(16069)T, T(16093)C, T(16126)C, A(16137)T/A
	SS18	1 C(16168)T
	SS19	2 T(16209)C, G(16273)T
	SS20	0 -
Pembanding	PP3	6 G(16145)A, A(16181)G, C(16192)T, C(16223)T, C(16291)T, T(16304)C
	PP4	5 C(16187)T, C(16223)T, C(16290)T, C(16296)T, G(16319)A
	PP5	2 C(16187)T, C(16223)T

data sampel dan pembandingan pernah disarankan untuk mempercepat identifikasi korban massal (Syukriani *et al.*, 2003). Namun, metode tersebut hanya menganalisis sampel yang menurut *phylogenetic tree* memiliki kekerabatan paling dekat, tanpa melakukan analisis yang lebih teliti terhadap sampel lain yang sebenarnya merupakan proses yang tidak dapat dikesampingkan dalam identifikasi forensik untuk mencegah terjadinya kesalahan sekecil mungkin.

Dalam proses identifikasi ini klasifikasi dilakukan tidak hanya untuk data dalam *database*, tetapi seluruh data sampel dan pembandingan juga diklasifikasi berdasarkan jumlah. Hal ini menyebabkan proses membandingkan relatif lebih mudah dilakukan. Sebagai contoh, pada kasus II pembandingan PP3 hanya perlu dibandingkan dengan sebagian kecil data (2 data).

Kriteria identik

Pola diturunkannya mtDNA menambah dimensi dalam pengambilan kesimpulan kasus identifikasi. Seluruh kerabat yang berada dalam garis keturunan ibu diperkirakan memiliki profil mtDNA yang sama. AFDIL (US Armed Forces DNA Identification Laboratory) mengindikasikan bahwa hasil penelitian menunjukkan laju mutasi mtDNA mencapai 1 per 33 generasi (Parsons *et al.*, 1997).

Hasil menunjukkan adanya sampel-sampel yang identik dengan pembandingan. Meskipun demikian, harus dipertimbangkan kemungkinan adanya variasi yang tidak terdeteksi. Proses identifikasi menggunakan mtDNA yang selama ini lazim dilakukan kenyataannya hanya melibatkan sebagian rangkaian mtDNA (HVSI/II; D-loop), sehingga terdapat kemungkinan ada perbedaan antara dua orang yang terletak di luar daerah tersebut tidak terdeteksi. TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*) menyarankan luas daerah yang dianalisis adalah nt 16024-16363 untuk HVSI dan nt 73-340 for untuk HVSII (Biosystems mtDNA Sequencing Protocol, 1996).

Telah diterima banyak pihak bahwa haplotipe mtDNA yang sama bukan saja dimiliki oleh orang-orang yang berada dalam satu garis keturunan ibu, namun dapat juga dimiliki secara kebetulan oleh orang lain. Beberapa haplotipe bahkan diketahui dimiliki oleh suatu

kelompok besar dalam suatu populasi. Meskipun metode identifikasi menggunakan mtDNA tidak dapat memberikan derajat kepastian identifikasi yang sangat tinggi, namun tetap dapat memberikan bukti petunjuk atas adanya suatu hubungan dalam kasus identifikasi. Beberapa penelitian telah menyarankan cara menghitung derajat kemungkinan adanya kesamaan profil mtDNA antara dua orang yang tidak memiliki hubungan kekerabatan dari garis ibu, namun satu sama lain saling berbeda, tergantung pada jumlah sampel dan metode statistik yang digunakan, meskipun nilai tersebut berkisar pada angka 5,5% (Stoneking *et al.*, 1991).

Arti identiknya urutan nukleotida antara dua orang telah ditafsirkan banyak ilmuwan dengan berbagai cara, namun komunitas forensik hingga saat ini belum mencapai konsensus tentang cara yang paling baik untuk hal tersebut. mtDNA hanya dianggap unggul jika kondisi sampel bahan pemeriksaan mengalami degradasi akibat lingkungan, sedangkan identifikasi menggunakan DNA inti diyakini telah mengatasi masalah ketidakpastian secara statistik dengan perhitungan kemungkinan identiknya profil antara dua orang secara kebetulan (*probability of a random match*) (Stoneking *et al.*, 1991; Wilson, 1998). Asumsi menggunakan persamaan Hardy-Weinberg yang digunakan untuk menghitung frekuensi genotipe pada DNA inti dianggap dapat menekan pengaruh yang mengurangi validitas suatu kesimpulan identifikasi. Oleh karena itu, meskipun statistika pada analisis mtDNA telah diupayakan oleh beberapa peneliti (Bar *et al.*, 2000; Syukriani *et al.*, 2004).

4. Kesimpulan

Identifikasi urutan nukleotida HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia untuk korban musibah massal, dapat dilakukan secara efektif dengan menggunakan sistem klasifikasi jumlah dan jenis perbedaan urutan nukleotida dengan standar. Dengan sistem ini, identifikasi tidak perlu membandingkan korban, pembandingan dan database secara keseluruhan, karena yang diperlukan hanya membandingkan sampel-sampel yang memiliki jumlah perbedaan dengan standar yang sama. Paradigma sistem klasifikasi HVSI nt 16024-16363 berdasarkan jumlah dan jenis perbedaan urutan nukleotida dengan standar yang diterapkan pada *database* gabungan ini dapat mendukung identifikasi

korban massal jika asal suku bangsa sulit diperkirakan, tanpa harus memilih terlebih dahulu *database* populasi tertentu untuk memperkirakan spesifisitas identifikasi yang menentukan *weight of the evidence*.

5. Ucapan Terima Kasih

Proses identifikasi mtDNA kasus musibah massal bom Jakarta, 12 September 2004 dan bom Bali, 12 Oktober 2002, tidak dapat terlaksana tanpa kerjasama banyak pihak, termasuk Kepala Kepolisian Negara Republik Indonesia, Tim DVI kedua kasus, KPP Bioteknologi ITB, Kelompok mtDNA ITB, Perjan RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung, dan semua pihak yang telah membantu. Pengembangan *database*, software dan metode identifikasi merupakan bagian penelitian yang dilaksanakan oleh Kelompok mtDNA Departemen Kimia ITB yang dibiayai oleh Hibah Pascasarjana periode 2004-2006 dari Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia.

6. Daftar Pustaka

A.S. Noer, Maelita R., Yoni F.S., Henny Y.Z., I.R. Sudji, Syafrizayanti, Y. Ngili, Merlyn S., (2005). Paradigma baru dalam analisis mtDNA manusia. *Prosiding Seminar Bersama UKM-ITB VI*.

Allen M., Engstrom A-S., Meyers S., Handt O., Saldeen T., von Haeseler A., (1998). Mitochondrial DNA Sequencing of Shed Hairs and Saliva on robbery caps; sensitivity and matching probabilities. *J. For. Sci.*, 43(3):453-464

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Scheier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G., (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nat.*, 290:457-465.

Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers N., Turnbull D.M., Howell N., (1999). *Nat.Genet.*, 23:147.

Bar W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Holland M., Lincoln P.J., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P.M., Tully G., Wilson M., (2000). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int. J. Legal Med.*, 113:193-196.

Boles T.C., Snow C.C., Stover E., (1994). For. DNA testing on skeletal remains from mass graves: A pilot project in Guatemala. *J. For. Sci.*, 40(3):349-355.

Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C., (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nat.*, 325:31-36.

Elson., J. L. *et al.*, (2001). Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am. J. Hum. Genet.*, 68:145-153.

Eyre-Walker A., Smith N.H., Smith J.M., (1999). How clonal are human mitochondria? *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 266:477-483.

Finnila S., Hassinen I.E., Ala-Kokko L., Majamaa K., (2000). Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.*, 66:1017-1026.

Jehaes E., Gilissen A., Cassiman J.J., Decorte R., (1998). Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *For. Sci. Int.*, 94:65-71.

Holland M.M., Fischer D.L., Mitchell L.G., Rodriguez W.C., Canik J.J., Merrill C.R., Weedn V.W., (1993). Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the vietnam war. *J. For. Sci.*, 38:542-553.

Holland M.M., and Parson T.J., (1998). MtDNA Databases. *Mitochondrial DNA Sequence Analysis in For. Casework: Methods and Current Issues*. Innsbruck., 9 June 1998.

Hochmeister M.N., (1995). DNA Technology in forensic applications. *Mol. Asp. Med.: Rev. J. Phys. Biomed. Sci.*, 16(4):319-410.

Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Valentina G., Scozzari R., Bonne-Tamir B., Sykes B., Torroni A., (1999). The emerging tree of west Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequence and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.*, 64:232-249.

Merlyn S. dan Noer A.S., (2005). Klasifikasi HVSI nt 16024-16364 mtDNA manusia ke dalam haplogrup dan haplotipe. *Prosiding Seminar Bersama UKM-ITB VI*.

Noer A.S., Martasih F., Mulyani S., Muktiningsih., Wirahadikusumah M., (1994). Analisis variasi urutan nukleotida D-loop mtDNA manusia dari berbagai daerah di Indonesia. *Prosiding Seminar Bersama UKM-ITB I*, pp. 201-214.

Parsons T.J., Munied D.S., Sullivan K., Woodyatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M.R., Berry D.L., Holland K.A., Weedn V.W., Gill P., Holland M.M., (1997). A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat.Genet.*, 15(4):363-368.

- Sajantila A., Salem A.H., Savolainen P., Bauer K., Gierig C., Paabo S. 1996. Paternal and maternal DNA lineages reveal a bottleneck in the founding of the Finnish population. *Proc. National Academy Sci.*, 93:12035-12039.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. National Academy of Sci. USA.*, 74(12):5463-5467.
- Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi RG., Vigilant L., Erlich H.A., (1991). Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet.*, 48:370-382.
- Stoneking M., (1993). DNA and recent human evolution. *Evol. Anthro.*, 2: 60-73.
- Sigurgardottir S., Helgason A., Gulcher J.R., Stefansson K., Donnelly P., (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.*, 66:1599-1609.
- Syukriani Y.F., Sampurna B., Noer A.S., (2003). The Korean girls case: an illustration of mtDNA D-loop analysis role in Bali Bomb blast victim identification. *Seminar of the 8th Asia Pasific Association of Societies of Pathologists Congress*, pp. 50.
- Syukriani Y.F., Sudji I.R., Noer A.S., (2004). Pemanfaatan perangkat lunak spreadsheet Excel untuk analisis mutasi DNA. *Proceeding Seminar MIPA IV. Institut Teknologi Bandung*. pp. 472-475.
- Wallace D.C., (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease., (1994). *Proceeding National Academy of Sci.*, 91:8739-8746.
- Wallace D.C., (1995). Mitochondrial DNA variation in human evolution., degenerative disease and aging. *Am. J. of Hum. Genet.*, 57:201-223.
- Wilson M.R., DiZinno J.A., Polansky D., Replogle J., Budowle B., (1995). Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int. J. Legal Med.*, 108(2):68-74.
- Wilson M.R. *Mitochondrial DNA heteroplasmy (Mitochondrial DNA sequence analysis in forensic casework: method and current issues workshop)*. Innsbruck, 9 June 1998.

Photodegradation of Ethylene in ETS-4

Yuni K. Krisnandi¹⁾ and Russell F. Howe²⁾

1) Department of Chemistry, University of Indonesia
Depok, 16424, Indonesia
e-mail: ykrisna@ui.edu

2) Department of Chemistry, University of Aberdeen
Meston Walk, Aberdeen, AB24 3UE, Scotland UK
e-mail: r.howe@abdn.ac.uk

Abstract

ETS-4 sampel, a microporous titanosilicate material, was prepared as Na,K-form using a hydrothermal method. The resulting powder then was subjected to NH_4 and Na(back) exchange treatment to modify the degree of defects within the structure. Characterisation work on the resulting products shows that the treatments have increased the concentration of defects in the structure. Photoreactivity of adsorbed ethylene in ETS-4 materials under UV-irradiation was studied using in-situ FTIR method. When ETS-4 samples were irradiated in the presence of adsorbed ethylene, small amount of partial oxidation products were formed, as shown by the presence of carbonyl and carboxyl groups in the region below 1800 cm^{-1} . Furthermore, partial oxidation products (acetaldehyde, acetic acid and acetate) and carbon dioxide (a complete oxidation product) were observed when ETS-4 was irradiated in the presence of a mixture of ethylene and oxygen (ratio 1:4). The increase in the concentration of structure defects has shown to influence the photoreactivity of ETS-4, in which Na(be)-ETS-4 show to be more photoreactive than the as-prepared Na,K-ETS-4. The results are comparable to that of ETS-10, another member from ETS family in which its photoreactivity study has been studied extensively. This result gave information that could contribute to the development of titanosilicate materials as alternative photocatalysts.

Keywords: titanosilicate, microporous, ETS-4, photoreactivity, ethylene.

1. Introduction

Ethylene is a growth hormone produced by plant tissue that triggers the ripening of fruits and vegetables. Therefore, it is very important to remove ethylene from the air in the enclosed systems such as fruits and vegetables storages to prevent spoilage and increase the products' life. The photocatalytic properties of TiO_2 have been utilized widely to decompose the ethylene to become CO_2 and water. This research has been studied by many groups such as Park *et.al* (1999). On the other hand, the photo-oxidation study of ethylene in ETS-10, an infamous member of Engelhard Titanosilicate (ETS) microporous materials, was also reported, Howe *et.al* (2001), Krisnandi *et.al* (2003). The photocatalytic behaviour of ETS-10 is shown to be different from that of the

commercially available Degussa TiO_2 , in which the photo-degradation of ethylene in ETS-10 led to the formation of partial oxidation products such as acetaldehyde and acetic acid together with the formation of CO_2 and water. This can be caused by the unique structure of ETS-10, in which the octahedral TiO_6 chains are insulated by tetrahedral SiO_4 sheath, Anderson *et.al* (1995).

ETS-4 is another member from ETS family with structure related to Zorite, a natural zeolite Philippou *et.al* (1996) is also comprised with octahedral TiO_6 chains running in *b* direction, connected by tetrahedral silicate in *c* direction and by titanosilicate bridging units in *a* direction, as shown in Figure 1, Philippou *et.al* (1996), Nair *et.al* (2001). The TiO_6 chain can be regarded as a 1D nanorod semiconductor, as

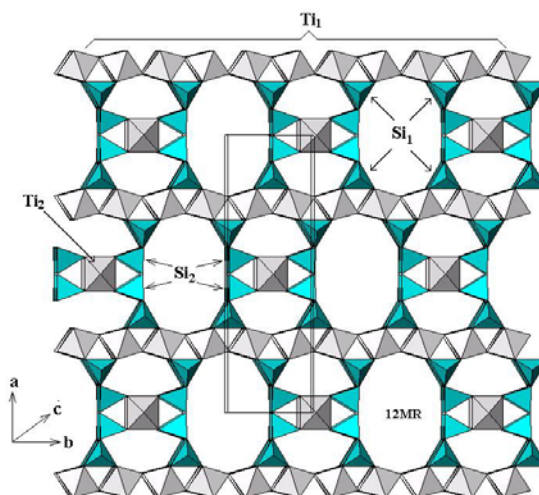


Figure 1 Schematic diagram of ETS-4 structure. Ti presents as octahedral Ti_1 in Ti-O-Ti chains and semioctahedral / square bipyramidal Ti_2 in Titanosilicate bridging unit.

that of ETS-10, Lamberti (1999). The titanium in the bridging units was reported as semioctahedral Philippou *et.al* (1996) or five-coordinated in a square pyramidal environment Nair *et.al* (2001). The structure of ETS-4 is inherently disordered because of an intergrowth of four polymorph during synthesis, Braunbarth *et.al* (2000).

The application of as-synthesised ETS-4 (with Na^+ and K^+ as extraframework cations) has been suppressed by the fact that the structure of ETS-4 collapsed when it is calcined in the oven at above $200^\circ C$, Philippou *et.al* (1996). However, some low-temperature application such as prevaporation membrane for alcohol/water separation has been reported, Braunbarth *et.al* (2000). In this paper, based on the presence of titanium semiconductor in the framework of ETS-4, the investigation on the photo-oxidation of ethylene on ETS-4 samples is reported. The influence of defect content on the photoreactivity of ETS-4 is discussed. A post-synthesis, ion-exchange treatment, was applied to increase the defect concentration in the ETS-4 material.

2. Experimental

Sample preparation. Na,K -ETS-4 was synthesized followed a reported procedure, Kuznicki (1990). Titanium(III) chloride (15% in HCl, Merck) and sodium silicate solution (27 wt% SiO_2 , 8wt% Na_2O , Merck) are used as titanium and silicon source, respectively. The resulting sample then was washed by double distilled water and dried at room temperature in

a desiccator overnight. Na -ETS-4 was prepared by ion exchange of as-synthesized Na,K -ETS-4. Firstly, the as-synthesized ETS-4 was exchanged with 1 M NH_4NO_3 solution at $60^\circ C$ for 6 hours for several times to give NH_4 -ETS-4 sample. Then, the NH_4 -ETS-4 sample was subjected to 1 M $NaNO_3$ solution to obtain Na -back exchanged sample. From this point onward this sample was called $Na(be)$ -ETS-4.

Characterization. X-ray diffraction data were collected in Stoe STADI/P diffractometer using $Cu K\alpha$ radiation, 2-theta range of 4-50 degree and a step width of 0.2° . SEM images were obtained using a JEOL 2000EX Temscan microscope. UV-Vis diffuse reflectance spectra were obtained on an UV-3100 Shimadzu using $BaSO_4$ as an external standard. The apparent bandgap energy of the sample were determined from the first-derivative of the Kubelka-Munk spectra.

Photoreactivity study. The photoreactivity studies of ETS-4 in the presence of adsorbed ethylene, with and without the presence of adsorbed oxygen, were carried out in an infrared vacuum cell with a quartz end on a Nicolet FTIR Nexus spectrometer. Here, about 20 mg of sample was pressed into a transparent self-supporting pellet and loaded into the infrared cell. The pellet then was evacuated at $150^\circ C$ and 1×10^{-5} KPa for 2 hours. Ethylene gas was then introduced into the cell after it was cooled down at room temperature. Irradiation was carried out for 6 hours in total using a pair of unfiltered UVitec[®] lamps with

light intensity of $1800 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Similar conditions were applied in the photo-oxidation experiment in the presence of oxygen, except a mixed gas of ethylene and oxygen (pressure ratio 1:4) was used.

3. Results and Discussion

The diffraction pattern of Na,K-ETS-4 and Na(be)-ETS-4 are given in Figure 2. The patterns of both ETS-4 samples were consistent with the reported powder pattern, Philippou *et.al* (1996), Braunbarth *et.al* (2000), Nair *et.al* (2001), although some peaks had different intensity. This indicates that the structure of

ETS-4 was still maintained after the sample was subjected to Na-back exchanged treatment.

SEM images of ETS-4 samples were displayed in Figure 3. The morphology of the as-prepared Na,K-ETS-4 crystals are similar to those reported in literature, Amaroli *et.al* (2000), Pavel *et.al* (2002). The morphology of the bulk crystals of Na(be)-ETS-4 is slightly different from that of the as-prepared sample, in which the crystals become more defective. Furthermore, it can be seen that some fine particles appear on the surface of the crystals. This indicates that the crystals were damaged

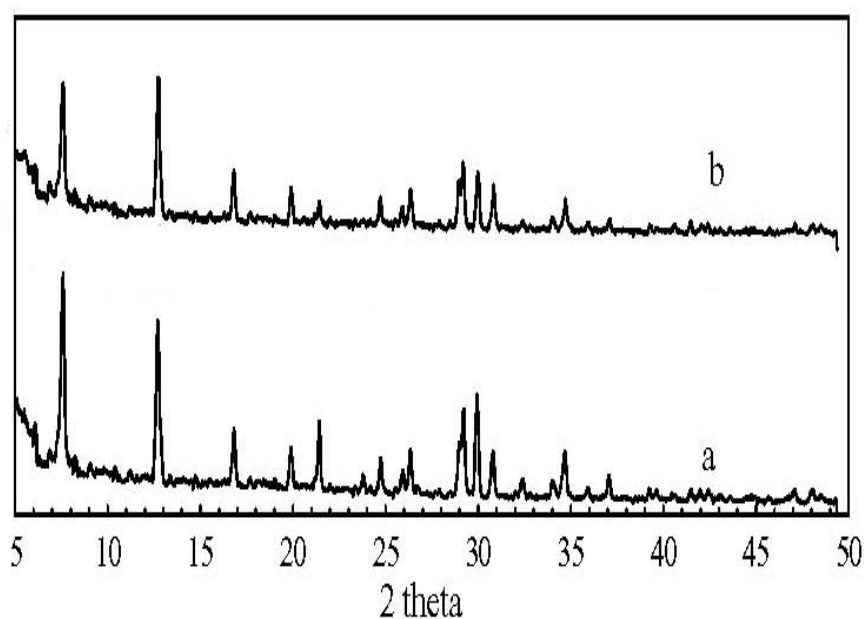


Figure 2 XRD powder pattern of: a. Na,K-ETS-4 and b. Na(be)-ETS-4

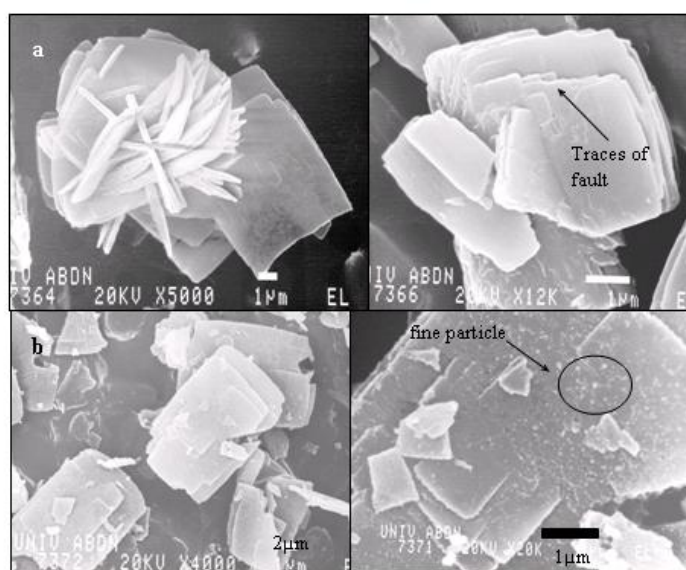


Figure 3 SEM images of a. Na,K-ETS-4 and b. Na(be)-ETS-4

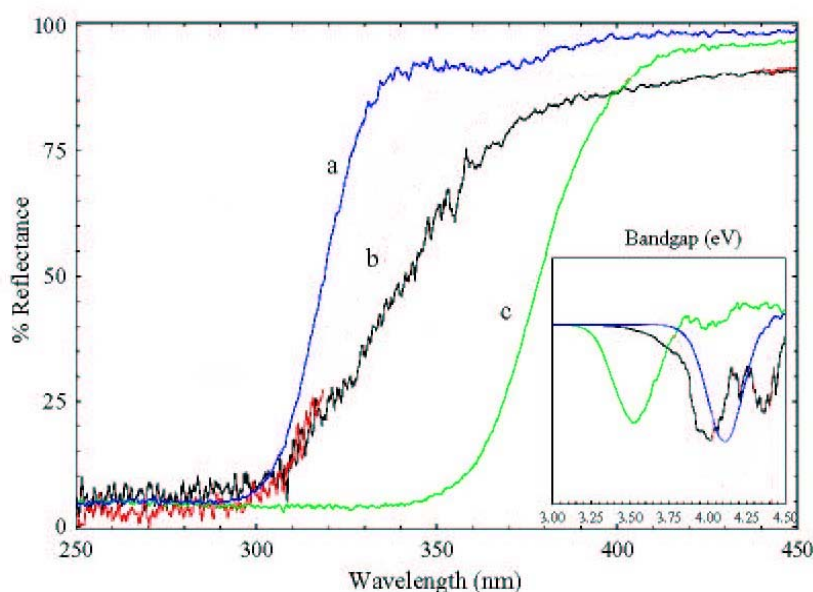


Figure 4 UV Diffuse reflectance of a. Na,K-ETS-4, b. Na(be)-ETS-4 and c. Anatase (TiO₂). Inset: 1st derivative of Kubelka-Munk functions with the minima \approx the apparent bandgap (right to left = a-c)

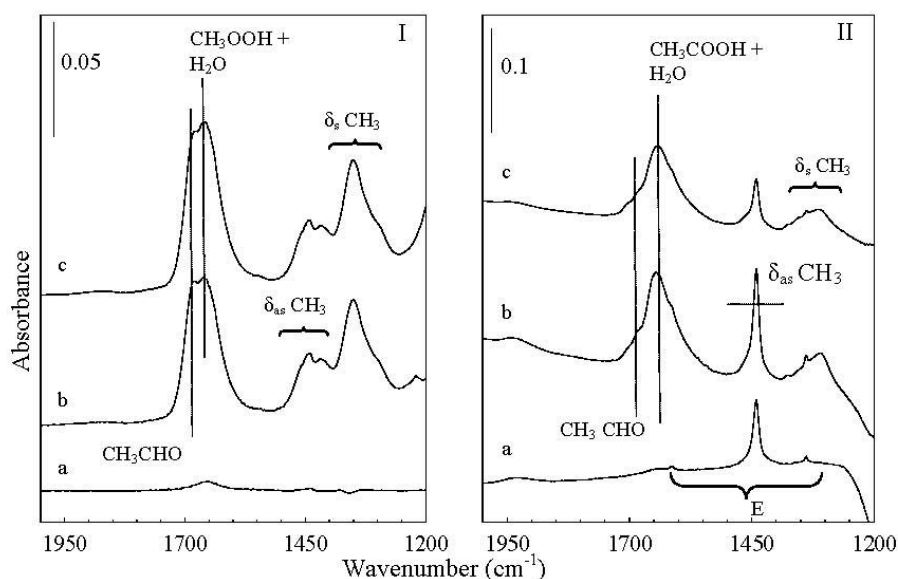


Figure 5. Subtracted IR spectra of: I. Na,K-ETS-4 and I. Na(be)-ETS-4. After: a. introduction of ethylene, b. UV irradiation for 6 hours, c. evacuation at RT

after the sample was subjected to Na-back exchange treatment.

Diffuse-reflectance spectra of ETS-4 samples are shown in Figure 4, with absorption appear in the wavelength below 500 nm. The spectrum of as-prepared Na,K-ETS-4 gives a sharp absorption edge with the center at 315 nm and the apparent bandgap (E_g) of 4.12 eV (see inset). Compared to the spectrum of the anatase TiO₂ (Figure 4c), the position of its absorption

edge is blue shifted to a shorter wavelength. As a result, its apparent band gap is higher from that of anatase (3.53 eV). This is due to the ‘quantization effect’ that occurs when the size of the semiconductor particle is down nano-scale, Liu (1997). The spectrum of the Na(be)-exchanged sample shows that the absorption edge is red shifted with the center at 340 nm (E_g of 3.95 eV). This indicates that electronic transitions within the ETS-4 structure are slightly modified after ion exchange, caused by

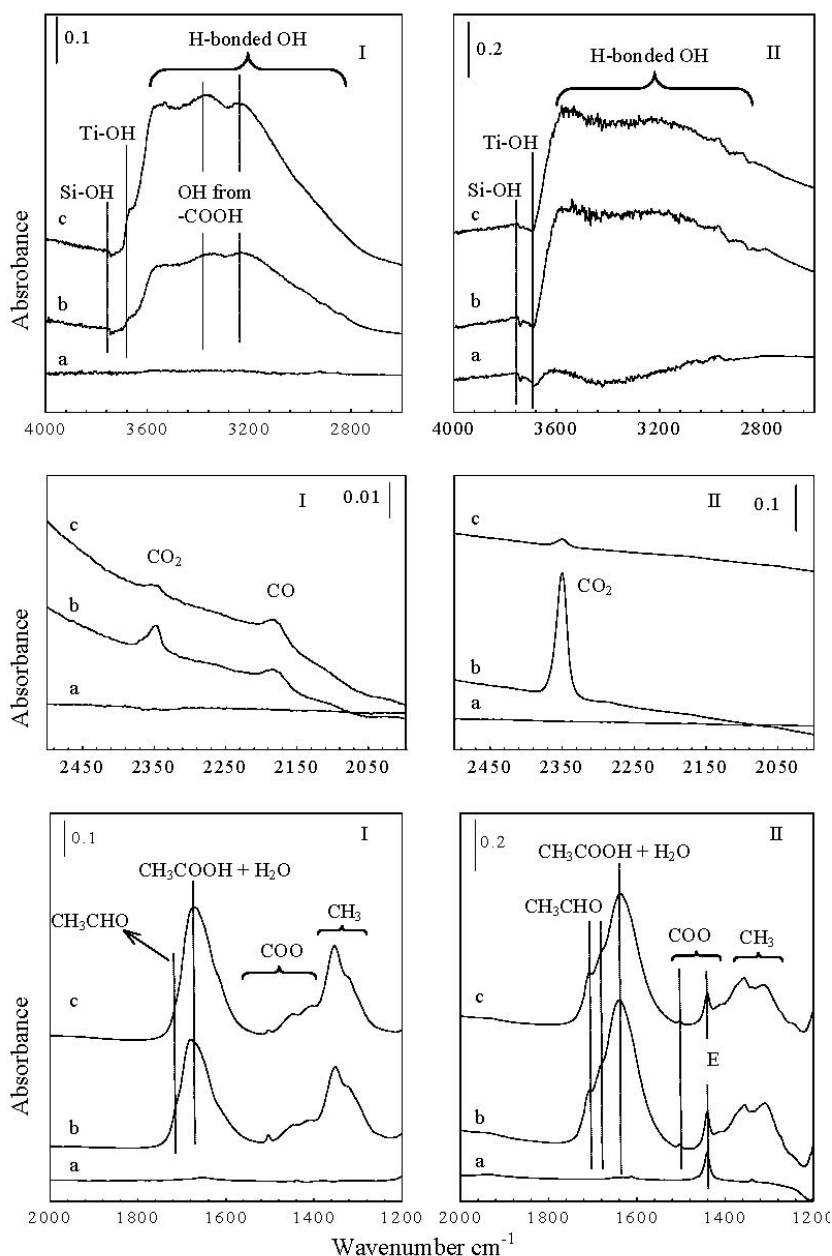


Figure 6. Comparison of infrared spectra (subtracted) of I. Na,K-ETS-4 and II. Na(be)-ETS-4 in the photo-oxidation of ethylene, after: a. introduction of ethylene+O₂ (1:4), b. UV-irradiation for 6 hours, b. evacuation at RT.

the increase of defect concentration in the structure.

Figure 5 shows the subtracted infrared spectra of as-prepared and Na-back exchanged ETS-4 samples collected during photoreactivity experiment in the presence of ethylene. The interaction between ethylene and the framework was detected in the Na(be)-ETS-4 sample (a sharp peak at 1441 cm⁻¹ assigned to ν_s CH₂ from C₂H₄) in Figure 5.IIb, but not in the as-prepared sample (Figure 5.Ib). This shows that back-exchanged sample adsorbs

ethylene better than the as-prepared sample, Krisnandi (2004). After 6-hour irradiation, the spectra of both samples show that some absorption bands were observed at 1687 cm⁻¹, 1651 cm⁻¹, 1443 cm⁻¹ and 1348 cm⁻¹. These bands, respectively, are assigned to ν (C=O) from carbonyl group, ν (C=O) superimposed with δ (OH) from carboxyl groups and molecular water, δ_{as} (CH₃) and δ_s (CH₃), Escrivano *et.al* (1990), Martin *et.al* (1993).

The presence of those bands indicates that UV-irradiation on ETS-4 samples in the presence of

ethylene has caused an incomplete photo-oxidation to ethylene. The ethylene was photo-degraded to become acetaldehyde and acetic acid, Krisnandi (2004). As no molecular oxygen was introduced to the sample in the vacuum cell, oxygen from the framework (O^{2-}) is suggested to be the oxygen source that oxidized ethylene. During irradiation, a pair of electron and positive hole (e/h^+) is photogenerated. The electron is adsorbed by titanium(IV) in the framework ($Ti^{4+} + e \rightarrow Ti^{3+}$) and O^{2-} traps the positive hole to create an active $\bullet O^-$ radical ($O^{2-} + h^+ \rightarrow \bullet O^-$). Ethylene then reacts with the $\bullet O^-$ radical species giving an ethylene oxide radical ($\bullet OCH_2-CH_2O^-$), Che *et.al* (1983). This ethylene oxide radical then reacts with more holes that photogenerated during irradiation so that acetaldehyde and acetic acid are produced. These results are very different from the polymerization of ethylene occurring in the ETS-10 samples, Howe *et.al* (2001), Krisnandi *et.al* (2003), Krisnandi (2004). However, the influence of defect concentration to the photoreactivity of the samples is the same, i.e. the more defective sample (Na(be)-ETS-4) gives more result.

Figure 6 shows the spectra recorded from photo-oxidation of ethylene when ETS-4 samples were irradiated in the presence of the mixture of ethylene-oxygen (1:4). It can be seen that photo-oxidation of ethylene occurs in both ETS-4 samples. After the as-prepared ETS-4 was irradiated for 6 hours (Figure 5-Ib), the spectrum shows a broad band appeared at 3565 cm^{-1} that was assigned to H-bonded hydroxyl groups, while the group of absorption bands in the region lower than 1800 cm^{-1} is also observed. These bands are related to the formation of acetaldehyde, acetic acid and water. Two absorption bands were observed at 2348 cm^{-1} and 2175 cm^{-1} , which are assigned to $\nu(C-O)$ from adsorbed CO_2 and CO , respectively, Brittain (1975). In the gas phase (not shown) an absorption band is also detected at 2349 cm^{-1} that is associated with CO_2 . The photocatalysis reaction takes place more extensive in the Na(be)-ETS-4, as more CO_2 and water are formed as the results of photo-degradation of ethylene. This result also shows that in the presence of abundance oxygen, total photo-oxidation of ethylene to CO_2 and water occurs in the ETS-4 samples, along with the formation of some partial oxidation products.

4. Conclusion

Photo-oxidation of ethylene has occurred in the ETS-4 system under UV-irradiation. When the oxygen lattice is the only source of oxygen, the photo-oxidation of ethylene is limited to the formation of acetaldehyde, acetic acid and a small amount of water. On the other hand, when there gaseous oxygen is available in abundance, the photo-oxidation also leads to total decomposition of ethylene. From this study, ETS-4 can be considered as a potential photocatalyst as an alternative from the conventional TiO_2 .

5. Acknowledgement

YK is grateful to Department of Chemistry, University of Aberdeen and ORS scheme for the financial support to undertake her PhD. The authors want to thank to Dr. Eric Lachkowski for SEM measurement.

6. Daftar Pustaka

- Anderson, M. W., Terasaki, O., Ohsuna, T., Mallet, P. J. O., Philippou, A.; Mackay, S. P., Ferreira, A.; Rocha, J.; Lidin, S., (1995), Microporous Titanosilicate ETS-10: A Structural Survey, *Phil. Mag. B*, 71(5), 813-841.
- Armaroli, T., Busca, G., Milella, F., Bregani, F., Toledo, G. P., Nastro, A., DeLuca, P., Bagnasco, G.; Turco, M., (2000), A study of ETS-4 molecular sieves and of their adsorption of water and ammonia, *J. Mater. Chem*, 10(7), 1699-1705.
- Braunbarth, C. M., Boudreau, L. C., Tsapatsis, M. (2000), Synthesis of ETS-4/ TiO_2 composite membranes and their pervaporation performance, *J. Membr. Sci.* 174(1), 31-42.
- Brittain, E. F. H., George, W. O., Wells, C. H. J., (1975) *In Introduction to Molecular Spectroscopy, theory and experiment*, Academic Press: Great Britain, pp 186.
- Che, M., Tench, A. J., (1983), Characterization and reactivity of molecular oxygen species on surfaces, *Adv. Catal.*, 32, 1-147.
- Escribano, V. S., Busca, G., Lorenzelli, V., (1990), Fourier transform infrared spectroscopic studies of the reactivity of vanadia titania catalysts towards olefins: 2. Ethylene, *J. Phys. Chem.*, 94(26), 8945-8950.
- Howe, R. F., Krisnandi, Y. K. (2001), Photoreactivity of ETS-10, *Chem. Commun.*, 1588-1589.
- Krisnandi, Y. K., Southon, P. D., Adesina, A. A., Howe, R. F., (2003), ETS-10 as Photocatalyst, *International Journal of Photoenergy*, 5(3), 131-140.

Yuni K, Krisnandi and Russell F. Howe R

- Krisnandi, Y. K., (2004), *Photoreactivity Studies of Microporous Titanosilicate Materials*, PhD Thesis, University of Aberdeen, Scotland, United Kingdom.
- Kuznicki, S. M., (1990) US Patent 4938939.
- Lamberti, C., (1999), Electron-hole reduced effective mass in monoatomic ...-O-Ti-O-Ti-O-... quantum wires embedded in the siliceous crystalline matrix of ETS-10, *Microporous Mesoporous Mater.* 30, 155-163.
- Liu, Y., Claus, R. C., (1997), *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5273-5274.
- Martin, C., Martin, I., Rives, V., (1993), *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89(22), 4131-4135.
- Nair, S., Jeong, H., Chandrasekaran, A., Braunbarth, C. M., Tsapatsis, M.; Kuznicki, S. M., (2001), Synthesis and structure determination of ETS-4 single crystals, *Chem. Mater.*, 13(11), 4247-4254.
- Park, D., Zhang, J., Ikeue, K., Yamashita, H., Anpo, M., (1999), Photocatalytic oxidation of ethylene to CO₂ and H₂O on ultrafine powdered TiO₂ photocatalysts in the presence of O₂ and H₂O, *Journal of Catalysis* 185, 114-119.
- Pavel, C. C., Vuono, D., Catanzaro, L., DeLuca, P., Bilba, N., Nastro, A., Nagy, J. B., (2002), Synthesis and characterization of the microporous titanosilicates ETS-4 and ETS-10, *Microporous Mesoporous Mater.*, 56, 227-239.
- Philippou, A., Anderson, M. W., (1996), Structural investigation of ETS-4 *Zeolites*, 16, 98-107.



Studi Komputasi Pengaruh Ligan Fluor Terhadap Pemecahan Orbital d pada Kompleks $[\text{Fe}(\text{F}_6)]^{4-}$

Yusthinus T. Male¹⁾, Djulia Onggo²⁾, Muhamad A. Martoprawiro²⁾, Ismunandar²⁾

1) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: yusmale@yahoo.com

2) Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia

Abstrak

Perpindahan intra-ionik dua elektron dalam skala nanodetik antara orbital e_g dan t_{2g} disebut transisi spin. Gejala ini umumnya diamati pada senyawa yang mengandung inti koordinasi $[\text{FeN}_6]$. Untuk mempelajari fenomena transisi spin, telah dilakukan studi komputasi untuk mempelajari pengaruh ligan fluor terhadap pemecahan orbital d pada kompleks $[\text{Fe}(\text{F}_6)]^{4-}$. Hasil studi komputasi menunjukkan bahwa ligan fluor berpengaruh terhadap energi pemecahan orbital d serta model transisi spin yang terjadi.

Paper is not available

Sequencing 16S rRNA gene of Tibicinid cicada species (Homoptera)

Badrul Munir Md-Zain, Vun Vui Fui, Azman Sulaiman & Zaidi M. Isa

School of Environmental and Natural Resource Sciences,
Faculty of Science and Technology,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor
Email: abgbadd@pkrisc.cc.ukm.my

Abstract

Total DNA of two Tibicinid cicada species, *Lemuriana* sp. and *Abroma maculicollis* (Geurine) (Homoptera: Cicadidae: Tibicinidae) collected during the recent scientific expedition to Gunung Mandi Angin, Terengganu, were extracted. The size of total DNA was each estimated to be around 20 KB base pairs. 16S rRNA gene fragment of each species was successfully amplified using the following PCR conditions: 30 cycles of denaturation (30 seconds; 94°C), annealing (120 seconds; 49°C), extension (90 seconds; 72°C) and final extension (9 minutes; 72°C). The PCR product size for this gene fragment was estimated to be 600 basepairs. The following step which involved sequencing of 16S rRNA of these species was conducted and found to be successful in detecting the genetic structure of each of these cicada species. The results confirmed that the male and female specimens of *Lemuriana* sp. were indeed belonged to this one species. *Lemuriana* sp. should be described as new species, since morphologically it differed from all known cicada species of the genus and the Tibicinid family which includes *A. maculicollis*. The results also indicated that sequences of *Lemuriana* would offer genetic variation which can be used to define its phylogenetic position to other members of Tibicinidae and possibly other cicadas as well.

Keywords: *Lemuriana*, Tibicinidae, Cicada, Mitochondria, 16S rRNA Sequences.

1. Introduction

To date, little work has been done on the molecular systematics of the Asian-Pacific cicadas. Asian cicada systematics has been based on morphological data (e.g., Duffels & Zaidi, 1999; Schouten & Duffels, 2002; Azman & Zaidi, 2002). Of the little molecular work, most has been on cicadas from New Zealand, Australia and New Caledonia (Buckley *et al.*, 2002). Since there has been no publication of molecular systematic work on Malaysian cicadas, this article represents the first attempt of providing DNA sequences to be used, in the near future, to possibly resolve the phylogeny of some of the Malaysian cicadas.

Preliminarily, DNA sequencing was conducted for selected specimens of cicada species of Tibicinidae from Peninsular Malaysia. These include 2 specimens of *Lemuriana* sp., (1 male and 1 female which showed morphological

variation, thus there was apparent doubt as to whether they do belong to this one species) and 1 male specimen of *Abroma maculicollis* (Guerine). In this study, the mitochondrial 16S rRNA gene was chosen mainly because this locus has been previously shown to be informative for insect systematic studies, particularly Hymenoptera (Belshaw & Quicke, 1997) and cicadas (Buckley *et al.*, 2002). The results obtained are presented herewith.

2. Material and Methods

Samples

A total of 3 cicada specimens, representing species of 2 genera, *Lemuriana* and *Abroma* (Tibicinidae), from Peninsular Malaysia, was used. The specimens were collected during the recent scientific expedition to Gunung Mandi Angin, Terengganu, in August 2004, organized by the Forestry Department of Peninsular Malaysia. The cicada specimens were obtained

through the usual light-trapping methods (e.g., Azman & Zaidi, 2004). The samples used in this study were all alcohol-preserved specimens and they were as listed in the Table 1.

Genomic DNA Extraction, Amplification and Sequencing

For each cicada specimen, the following procedure was carried out. Total genomic DNA was extracted from the specimen tissues, using Phenol-Chloroform extraction (Hillis *et al.*, 1996). The tissues with liquid nitrogen were ground, using a mortar and pestle, and crested to powder form before transferring them to appendorf tubes. An amount of 8-10 volume of the lyses buffer was then added together with 3 μ l of RNAase (10 mg/ μ l) and incubated for 1½ hours in the water bath at 37°C. Proteinase K (20 mg/ μ l) of 6 μ l was added after the first incubation and continued with the second incubation at 50°C for 2-4 hours in an incubator shaker. One volume of each phenol and chloroform was then added and thoroughly mixed. The mixture was then centrifuged at 6000 rpm for 15 minutes. The aqueous part was transferred to a new appendorf tube, and this phenol: chloroform process was repeated for 3-4 times. Once the process was completed, an amount of 1 ml of absolute ethanol and 20 μ l 3M sodium acetate were added, and the precipitation were carried-out at -20°C, overnight. The pellet obtained on the second day was dissolved in 30 μ l of ddH₂O and the total DNA was kept at -20°C for further steps.

The 16S rRNA amplification of 50 μ l in GeneAmp 2400 thermal cycler was carried out. Two primers, 16S-F (5'-CACCGTTTTATCAAAAACAT-3') and 16S-R (5'-CGTCGATTTGAACTCAAATC-3'), were used to amplify segment of 16S rRNA gene. The PCR products were then loaded onto 1 % agarose gel electrophoresis.

The following procedure of DNA sequencing was carried out to provide (as mentioned earlier in the introduction section) the currently much needed molecular systematic data to clarify phylogenetic relationships among Malaysian cicadas, species of various genera of the two families, Cicadidae and Tibicinidae. In this study, the case was species of the two genera of Tibicinidae.

3. Results and Discussion

DNA extraction products were visualized, at 1 % agarose gel in 1 X TAE at 90V. DNA sizes for all samples were estimated about 20 KB base pairs. Most of the bands were unclear and smeared. Nevertheless, successful amplification of the 16S rRNA fragment was obtained from all the 3 specimens of the species of the 2 Tibicinid genera, *Lemuriana* sp. and *A. maculicollis*.

Fig. 1 shows the purification gel after successful amplification of the Tibicinid species. The successful amplification was based on the PCR reactions that consist of 5 μ l 10X PCR buffer, 1 μ l 10mM dNTPs, 4 μ l 5.0 mM MgCl₂, 0.5 μ l 20 pmol/primer, 0.5 μ l 2.5U *Taq polymerase* and 36.5 μ l ddH₂O. The final total volume for the PCR reaction was 50 μ l. The PCR process was conducted in the GeneAmp 2400 thermal cycler with 30 cycles of denaturation (30 seconds; 94°C), annealing (120 seconds; 49°C), extension (90 seconds; 72°C) and final extension (9 minutes; 72°C). Based on the visualization on agarose gel, the PCR product size for 16S rRNA gene fragment was estimated to be around 600 basepairs.

The DNA sequencing conducted was found to be successful in detecting the genetic structure of each of these cicada species (Appendix 1). Appendix 1 shows the data matrix that consists of aligned 16S rRNA sequences of these cicada species. The sequences confirmed that the male and female specimens of *Lemuriana* sp. were indeed belonged to this one *Lemuriana* species. *Lemuriana* sp. should be described as new species, since morphologically it differed from all known cicada species of the genus and the Tibicinid family which includes *A. maculicollis*. The results also indicated that sequences of *Lemuriana* would offer genetic variation which can be used to define its phylogenetic position to other members of Tibicinidae and possibly other cicadas as well. In view of these, attempts would be made in the near future to extract and sequence DNA of other Malaysian cicadas, especially the other known species of *Lemuriana*, namely *Lemuriana connexa* Dictant and *Lemuriana chandea* Moulton, which to date known to be restricted to Borneo, especially Sarawak, only (Moulton, 1923, Zaidi & Ruslan 1998). It is envisaged that this would further substantiate

the proposal of *Lemuriana* sp. being a new species.

4. Acknowledgements

The authors thank Dr. Adura M. Adnan and Mr Mazlan Mohd Isa (Centre for Gene Analysis and Technology, CGAT) for the primers. Gratitude is also extended to the director and staff of the Department of Forestry, Peninsular Malaysia, and dean and staff of the Faculty of Science & Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, for the support and hospitality during the scientific expedition to Gunung Mandi Angin, where the samples of this study were obtained. Gratefully appreciated is the financial support for this study from the government of Malaysia through the IRPA grants 08-02-02-0019 EA301 and 09-02-02-0018 EA073.

5. References

Azman, S. & Zaidi. M. I. 2004. *Cicada (Homoptera: Cicadoidea) fauna of Endau Rompin State Park*. In Shaharuddin Mohamad Ismail, Mokhtar Mat Isa, W. Yusoff W. Ahmad, M. Rahim Ramli & A. Latiff (edt). *Taman Negeri Endau Rompin: Pengurusan, Persekitaran Fizikal dan Biologi*. pg. 163-178. Jabatan Perhutanan Semenanjung Malaysia.

Azman, S. & Zaidi. M. I. 2002. Two new species of the genus *Puranoides* Moulton from Malaysia (Homoptera: Cicadidae). *Serangga* **7 (1-2)**: 1-14

Belshaw, R. & Quicke, D. 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 281-293.

Buckley, T. R., Arensburger, P., Simon, C., & Chambers, G. K 2002. Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Syst. Biol.* **51(1)**: 4-18.

Duffels, J. P. & M. I. Zaidi. 1999. A revision of the genus *Orientopsaltria* Kato (Homoptera: Cicadidae) from Southeast Asia. *Tijdschrift voor Entomologie*. 142:195-297.

Moulton, J.C. 1923. Cicadas of Malaysia. *Journal of Federated Malay States Museum*, **11(2)**: 69-182.

Hillis, D. M., Moritz, C., and Mable, B. K. 1996. *Molecular systematics*, Sinauer, Massachusetts.

Schouten, M.A. & Duffels, J. P. 2002. A Revision of the Cicadas of the Purana carmentis Group (Homoptera: Cicadidae) from the Oriental Region. *Tijdschrift voor Entomologie*. **145**: 29-46.

Zaidi, M.I. & Ruslan, M.Y. 1998. Notes of cicadas (Homoptera: Cicadoidea) in the reference collection of Sarawak Museum. *Serangga* **3 (2)**: 343-371.

Table 1. Details of the samples

No	Taxa	Code No.	Sex	Locality
1	Tibicinidae <i>Lemuriana</i> sp.	SC 120	F	Sg, Cemerung, Mandi Angin, Terengganu
2	<i>Lemuriana</i> sp.	SC 123	M	Sg, Cemerung, Mandi Angin, Terengganu
3	<i>Abroma maculicollis</i> (Guerin)	SC 130	M	Sg, Cemerung, Mandi Angin, Terengganu

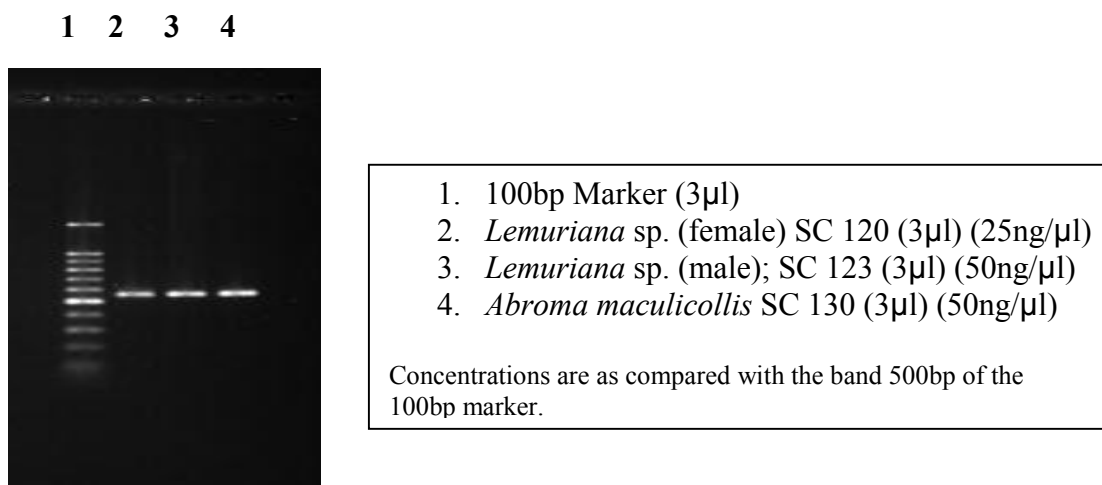


Figure 1. Purified PCR products with the size of the fragment \approx 550bp.

Appendix 1. Data matrix of aligned 16S rRNA sequences of Tibicinid cicada species.

```

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5      15      25      35      45      55
Lemuriana sp. (F) TCAAAAACATGTTCTTTAG-ATATAAATTAAAGATCTATTCTGCCCAATGATTTTTTAAAT
Lemiriana sp. (M) TCAAAAACATGTTCTTTAG-ATATAAATTAAAGATCTATTCTGCCCAATGATTTTTTAAAT
A. maculicollis TCAAAAACATGTCCTTTAGGATTTTTATTAAAGGTTTATTCTGCCCAATGATTTTTTGAAT

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      65      75      85      95      105      115
Lemuriana sp. (F) GGCCGCAGTAAATTGACTGTGCAAAGGTAGCATAATAATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTT
Lemiriana sp. (M) GGCCGCAGTAAATTGACTGTGCAAAGGTAGCATAATAATTAGTCTTTTAATTGAAGGCTT
A. maculicollis GGCTGCGGTAAATTGACCGTACAAAGGTAGCATAATAATTAGTCTTTTAATTGGAGGCT-

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      125     135     145     155     165     175
Lemuriana sp. (F) GTATGAATGAATGGATGAAAAATTTCTTTTTTAAATTTAAACTAATTGAATTTAAATTT
Lemiriana sp. (M) GTATGAATGAATGGATGAAAAATTTCTTTTTTAAATTTAAACTAATTGAATTTAAATTT
A. maculicollis GTATGAATGAATGGATGAGAAATTAACCTTTTTTTATTAAAAAAAATTGAATTTAAATTTT

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      185     195     205     215     225     235
Lemuriana sp. (F) AAGTAAAAAATCTTAAATAAATGAGTGGGACGAGAAGACCCTATAGAGTTTGAATAAATT
Lemiriana sp. (M) AAGTAAAAAATCTTAAATAAATGAGTGGGACGAGAAGACCCTATAGAGTTTGAATAAATT
A. maculicollis AAGTAAAAAAGTCTTAAATAAATTGAGTGGGACGAGAAGACCCTGTAGAGTTTAAAAATTTA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      245     255     265     275     285     295
Lemuriana sp. (F) TTTATTTATTGAA-ATTTAGA-ATTTATAG-TTAAAAAATTGATTTTATTTTTTGTGGG
Lemiriana sp. (M) TTTATTTATTGAA-ATTTAGA-ATTTATAG-TTAAAAAATTGATTTTATTTTTTGTGGG
A. maculicollis AAAATTTAATAATTATATAGATGAAAATAGATTTATAAATATATAAATTTTTTTGTGGG

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      305     315     325     335     345     355
Lemuriana sp. (F) GTGACATTTAAAAATAAATAA-CTTTAATTAATTTTCCATTTATTTATGTTTTATTGAT
Lemiriana sp. (M) GTGACATTTAAAAATAAATAA-CTTTAATTAATTTTCCATTTATTTATGTTTTATTGAT
A. maculicollis GTGACATT-AAAATAAATTAACCTTTTAATTAATGCGTCATAAATGAATGATTTATTGAT

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      365     375     385     395     405     415
Lemuriana sp. (F) CCAATTTTTTGATTTAAGATTAAATTACCTTAGGGATAACAGCGTAATTAATTCGAAGA
Lemiriana sp. (M) CCAATTTTTTGATTTAAGATTAAATTACCTTAGGGATAACAGCGTAATTAATTCGAAGA
A. maculicollis CCAATTTTTTGATTACAAGATTAAATTACCTCAGGGATAACAGCGTAATTAATTTGGAGA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      425     435     445     455     465     475
Lemuriana sp. (F) GTTCATATCGATGAATTAGATTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGAAAAGAATTTGAGGCA
Lemiriana sp. (M) GTTCATATCGATGAATTAGATTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGAAAAGAATTTGAGGCA
A. maculicollis GTTCATATCGATAAATTAGATTGCGACCTCGATGTTGGATTAAGAAAAGAGTT-AGGGCA

      ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      485     495     505     515     525     535
Lemuriana sp. (F) AAACCTAAGTATTTCTAGGTCTGTTTCGACCTTTAATTTCTTACATGATTTG-AGTTC
Lemiriana sp. (M) AAACCTAAGTATTTCTAGGTCTGTTTCGACCTTTAATTTCTTACATGATTTGGAGTTC
A. maculicollis AAACCTTGAAT---CCTGGGTCTGTTTCGACCTTTAATTTCTTACATGATTTGAGGTTTC

```

Ketoksikan Garam Ferosenium dan Kesannya ke Atas Parasit Malaria

Zainal-Abidin B.A.H.¹, Nurul Izza, N.², Bohari. M Yamin.³

¹Pusat Pengajian Biosains & Bioteknologi Fakulti Sains & Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia

43600 UKM Bangi Selangor, Malaysia. e-mail: zainala@pkrisc.cc.ukm.my

²SIRIM Berhad 1, Persiaran Dato' Menteri Section 2, P.O.Box 7035
40911 Shah Alam Malaysia e-mail: izza@sirim.my

³Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan
Fakulti Sains & Teknologi Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi Selangor, Malaysia. e-mail: bohari@pkrisc.cc.ukm.my

Abstrak

Garam ferosenium (terbitan ferosena) mempunyai beberapa aktiviti biologi yang penting seperti antikanser dan antimikrob. Dalam penyelidikan ini, sifat ketoksikan beberapa garam ferosenium dan kesannya ke atas parasit malaria telah dikaji. Dalam kajian pertama, ujian ketoksikan enam garam ferosenium terhadap larva nyamuk *Aedes albopictus* dan udang pepai *Artemia salina* pada kepekatan 10, 100 dan 1000mg/L dalam keadaan statik selama 24jam telah dilakukan. Hasil kajian mendapati semua garam adalah toksik terhadap kedua-dua bahan uji tersebut walaupun kematian larva pada kepekatan 10mg/L lebih rendah berbanding dua kepekatan yang lebih tinggi. Aktiviti ketoksikan terhadap *A. Albopictus* ditunjukkan seperti berikut: $Fc^+-ClO_4 > [Fc][SbCl_4] > Fc^+-SnCl_4 > Fc^+-SbCl_5 > HClO_4 > [Fc][BiCl_4] > [Fc^+-BiBr_4]_4$ manakala ketoksikan terhadap udang pepai pula adalah seperti berikut: $HClO_4 > Fc^+-ClO_4 > Fc^+-SnCl_4 > Fc^+-SbCl_5 > [Fc][SbCl_4] > [Fc][BiCl_4] > [(Fc)_4(BiBr_4)_4]$. Walau bagaimanapun darjah ketoksikan semua garam ini lebih rendah daripada ketoksikan kuprum logam. Dalam kajian kedua, mencit jantan strain ICR (Institute for Cancer Research) telah digunakan sebagai haiwan percubaan untuk dijangkiti dengan parasit malaria rodent *Plasmodium berghei* pzz1/00 pada takaran piawai 1×10^5 parasit per seekor mencit. Dalam kajian ini garam ferosenium tetrakloroantimonat ($[Fc][SbCl_4]$) dan ferosenium stanum tetraklorida (Fc^+-SnCl_4) telah digunakan untuk meneliti kesannya ke atas parasit malaria dalam mencit berbanding kesan bahan antimalaria piawai iaitu klorokuina menggunakan takaran piawai 10mg/100g berat badan (BB). Kumpulan-kumpulan mencit telah diperlakukan seperti berikut: menerima rawatan awal (pra-rawatan) dengan bahan-bahan uji tersebut (sama ada rawatan tunggal atau rawatan campuran 1:1 (garam ferosenium:klorokuina) 30 minit sebelum disuntik dengan parasit malaria, dirawat pada hari ke-5 atau ke-6 setelah mencit mendapat jangkitan parasit (darjah parasitemia atau darjah jangkitan darah 5-20%) dan diulang rawatan antara hari ke-12 dan ke-14 ataupun mencit diberi rawatan pertama pada hari ke-6 dan rawatan kedua apabila parasitemia mencapai 20-30%. Hasil kajian menunjukkan peningkatan parasitemia yang lebih perlahan pada mencit yang menerima rawatan tunggal garam ferosenium berbanding parasitemia yang meningkat dengan cepat pada mencit kumpulan kawalan positif (terjangkit tetapi tidak dirawat). Dalam rawatan campuran pula didapati parasitemia pada mencit menjadi lebih rendah lagi. Walaupun rawatan ini tidak berjaya memulihkan mencit daripada jangkitan tetapi tempoh kemandiriannya lebih lama dan berbeza secara signifikan ($p < 0.05$) dengan tempoh kemandirian mencit kawalan positif. Sebagai perbandingan mencit yang dirawat dengan klorokuina pulih daripada jangkitan malaria dan hidup > 30 hari selepas dijangkiti. Hasil penyelidikan ini menunjukkan bahawa garam ferosenium mempunyai kesan ke atas perkembangan parasit malaria walaupun ia bersifat toksik. Kajian lanjut perlu dilakukan bagi memastikan potensi garam ferosenium sebagai calon bahan antimalaria yang baru.

Kata kunci: ferosena, garam ferosenium, ketoksikan, parasitemia, parasit malaria

1. Pendahuluan

Ferosenium adalah kation yang terhasil apabila sebatian ferosena mengalami pengoksidaan melalui tindak balas elektrokimia, fotokimia dan pengoksidaan dengan sebatian organik atau sebatian tak organik. Kajian dan sintesis garam ferosenium telah lama dijalankan termasuklah yang diusahakan di Malaysia misalnya oleh Yamin et al. (1998), Yamin et al. (1996) dan Nordin et al. (2000). Garam ini mempunyai potensi aplikasi yang luas misalnya dalam bidang elektrokimia sebagai polimer elektrolit dalam bateri pepejal atas sifat kekonduksiannya yang tinggi (Hashim 1999). Dalam aspek biologi pula, ia didapati mempunyai aktiviti antikanser, antimikrob, antikulat malah antiparasit iaitu antimalaria. Garam ferosenium tetrakloroferat mempunyai aktiviti antitumor terhadap sel tumor Ehrlich (EAT; Kopf-Maier et al. 1984; Osella et al. 2000). Garam ferosenium juga didapati bertindak sebagai medium bagi tindak balas redoks dalam aplikasi biosensor glukosa (Gregg & Heller 1989). Sifat antimalaria garam ferosenium ini telah mula diketahui menerusi kajian yang dilakukan oleh Biot et al. (1997 dan 1999a,b) dan oleh Dormale et al. (1998).

Dalam kajian terdahulu sebanyak enam jenis garam ferosenium telah berjaya disintesis (Nordin 2003). Dalam kertas kerja ini dibentangkan percobaan mengenai ketoksikan garam-garam tersebut menggunakan bahan uji piawai iaitu udang pepai *Artemia salina* dan larva nyamuk *Aedes albopictus* dan mengenal pasti aktiviti antimalaria masing-masing terhadap malaria rodent *Plasmodium berghei*.

2. Percobaan

I) Ujian ketoksikan garam ferosenium.

Enam garam ferosenium (Nordin 2003) dalam bentuk hablur/serbuk iaitu ferosenium-stanium tetraklorida ($\text{Fc}^+\text{-SnCl}_4$), ferosenium tetrakloroantimonat ($[\text{Fc}][\text{SbCl}_4]$), ferosenium antimoni pentaklorida ($\text{Fc}^+\text{-SbCl}_5$), ferosenium heksadekabromotetrabismutat ($[\text{Fc}]_4\{\text{BiBr}_4\}_4$), ferosenium tetraklorobismutat ($[\text{Fc}][\text{BiCl}_4]$) dan ferosenium perklorat ($\text{Fc}^+\text{-ClO}_4$) serta asid perklorat (HClO_4) sebagai kawalan positif. Bahan-bahan ini dilarutkan dalam air nyahklorin dalam kepekatan 10, 100 dan 1000mg/L. Dalam ujian ketoksikan akut

terhadap larva nyamuk, instar ketiga *A. albopictus* telah digunakan. Larva ujian dimasukkan ke dalam botol spesimen yang mengandungi 10ml larutan garam ferosenium dengan kepekatan yang berbeza (Nordin 2003). Setiap kepekatan mempunyai tiga replikasi dan setiap replikasi mempunyai 10 ekor larva. Replikasi ini diulang bagi kawalan positif (asid perklorik) dan kawalan negatif air nyahklorin. Sediaan ini dibiarkan pada suhu bilik 26-28⁰C dan kematian larva dalam tempoh 24j direkodkan.

Pendekatan yang sama digunakan untuk ujian ketoksikan terhadap udang pepai *A. salina*. Dalam ujian ini udang pepai berumur 48j (iaitu pada peringkat nauplius) telah digunakan. Udang pepai ini didedahkan kepada kepekatan 10, 100 dan 1000mg/L garam-garam tersebut yang telah dilarutkan dalam larutan garam piawai NaCl 20g/L. Udang pepai dimasukkan ke dalam botol spesimen yang mengandungi 5ml larutan garam. Setiap kepekatan garam mempunyai tiga replikasi dan setiap replikasi mempunyai 10 ekor udang pepai. Sediaan dibiarkan pada suhu bilik 26-28⁰C dan peratus kematian udang pepai ditentukan dalam tempoh 24j. Kawalan positif terdiri daripada asid perklorik yang dilarutkan dalam larutan garam piawai yang juga bertindak sebagai kawalan negatif..

2) Ujian aktiviti antimalaria

Dalam ujian ini, parasit malaria rodent *P. berghei* pzz1/00 telah digunakan. Ia dipelihara dalam mencit jantan strain ICR (Institute for Cancer Research) secara pindahan mingguan darah terjangkit. Bagi memulakan jangkitan pada mencit percobaan takaran malaria 1×10^5 parasit per setiap ekor mencit telah digunakan. Darjah jangkitan atau parasitemia dalam darah mencit ditentukan setiap hari dengan menyediakan slaid darah berwarna Giemsa daripada setiap ekor mencit. Bagi percobaan kali ini garam ferosenium tetrakloroantimonat ($[\text{Fc}][\text{SbCl}_4]$) dan ferosenium stanium tetraklorida ($[\text{Fc}^+\text{-SnCl}_4]$) telah dipilih untuk uji kesannya ke atas parasit malaria. Aktiviti antimalaria ini dibandingkan dengan aktiviti bahan antimalaria piawai yang dipilih iaitu klorokuina pada kepekatan 10mg/100g berat badan (BB) mencit. Semua larutan bahan ujian dilarutkan dalam air suling. Sebanyak tiga

kelompok utama mencit (setiap kelompok terdiri daripada kumpulan-kumpulan enam ekor mencit yang masing-masing menerima perlakuan rawatan yang berbeza) telah digunakan untuk ujian ini iaitu:

a) kelompok mencit yang menerima rawatan awal (pra-rawatan) larutan bahan-bahan uji tersebut sama ada rawatan tunggal atau rawatan campuran 1:1 (garam ferosenium:klorokuina), 30 minit sebelum mencit disuntik dengan parasit malaria;

b) kelompok mencit yang menerima rawatan setelah jangkitan parasit bermula (rawatan pos-jangkitan). Rawatan diberikan pada hari ke-5 atau ke-6 setelah mencit menerima suntikan parasit (dengan darjah parasitemia antara 5-20%) dan diulang rawatan antara hari ke-12 hingga -14 dan

c) kelompok mencit yang menerima rawatan pos-jangkitan pada hari ke-6 dan rawatan kedua apabila parasitemia mencapai 20-30%.

3. Hasil dan pembahasan

Ujian ketoksikan telah dapat menjelaskan sifat ketoksikan garam-garam ferosenium ke atas dua bahan uji yang digunakan (Jadual 1). Secara amnya boleh dikatakan bahawa semua garam ferosenium yang diuji adalah toksik. Didapati juga bahawa udang pepai lebih sensitif terhadap garam-garam ini berbanding larva nyamuk.

JADUAL1. Tahap ketoksikan (purata % kematian) garam ferosenium dalam kesemua kepekatan terhadap larva nyamuk *A. albopictus* (A) dan udang pepai (*A. salina*) (B).

a-c: turus dengan abjad yang sama tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

Semua garam ferosenium menunjukkan tahap ketoksikan yang sama terhadap larva nyamuk *A. albopictus* pada ketiga-ketiga kepekatan 10, 100 dan 1000mg/L. Walau bagaimanapun terdapat perbezaan ketoksikan yang bererti ($p < 0.05$) pada kepekatan 100 dan 1000mg/L dan sebaliknya tiada perbezaan yang bererti ($p > 0.05$) di antara semua garam pada kepekatan 10mg/L dengan menunjukkan kadar kematian yang rendah yang konsisten bagi semua garam yang diuji. Hasil kajian juga mendapati larva nyamuk masih mampu bertahan pada kepekatan 10 dan 100mg/L malah 100mg/L asid perklorik berbanding garam ferosenium

perklorat dan korelasi aktiviti ketoksikan antara kedua-duanya adalah lemah ($r = 0.674$). Perbezaan aktiviti yang ketara ini menunjukkan memang garam ferosenium adalah toksik terhadap larva nyamuk yang diuji. Umumnya aktiviti ketoksikan garam ferosenium terhadap larva nyamuk *A. albopictus* dapat ditunjukkan sebagai berikut: $Fc^+ - ClO_4 > [Fc][SbCl_4] > Fc^+ - SnCl_4 > Fc^+ - SbCl_5 > HClO_4 > [Fc][BiCl_4] > [Fc^+ - BiBr_4]_4$.

Ketoksikan garam ferosenium terhadap udang pepai menunjukkan tidak kurang daripada 60% kematian berlaku pada kepekatan 10mg/L dan 100% kematian bagi kepekatan ≥ 100 mg/L dan garam-garam ini menunjukkan darjah ketoksikan yang berbeza secara signifikan ($p < 0.05$; Jadual 1). Korelasi aktiviti ketoksikan antara asid perklorik dan ferosenium perklorat adalah sangat kuat ($r = 1.00$). Memandangkan ketoksikan asid perklorik lebih tinggi terhadap udang pepai berbanding larva nyamuk *A. albopictus* maka dapat disimpulkan bahawa udang pepai lebih sensitif terhadap keadaan berasid berbanding larva nyamuk yang lebih rintang. Kerintangan larva nyamuk ini mungkin boleh dijelaskan dengan kemampuannya untuk hidup di mana-mana permukaan air seperti longkang, tin-tin kosong dll (Romi 1995) sebagai suatu adaptasi terhadap keadaan persekitaran di mana larva nyamuk itu hidup (Mallus 1982). Jujukan ketoksikan garam-garam ini terhadap udang pepai boleh ditunjukkan sebagai berikut: $HClO_4 \sim Fc^+ - ClO_4 > Fc^+ - SnCl_4 > Fc^+ - SbCl_5 > [Fc][SbCl_4] > [Fc][BiCl_4] > [(Fc)_4(BiBr_4)_4]$.

Hasil-hasil ujian ketoksikan ini jelas menunjukkan bahawa garam-garam ferosenium yang diuji adalah toksik dengan udang pepai menunjukkan kesensitifan yang lebih tinggi berbanding larva nyamuk. Namun begitu darjah ketoksikan ini adalah lebih rendah berbanding garam kuprum (Romi et al. 2000) kerana kuprum boleh menyebabkan kematian larva nyamuk pada kepekatan yang begitu rendah iaitu 1000ppb atau 1000ug/L. Selain saiz, struktur anion pada garam juga memainkan peranan dalam ketoksikan ini (Sanchez-fortun et al. (1996). Pada amnya semakin besar saiz anion semakin kurang ketoksikan garam tersebut.

Beberapa dapatan penting telah diperolehi mengenai ciri antimalaria yang ditunjukkan oleh garam ferosenium terhadap malaria rodent

P. berghei tersebut. Pada amnya rawatan dengan garam ferosenium tunggal menunjukkan aktiviti antimalaria yang tidak begitu nyata tetapi rawatan dengan campuran garam ferosenium-klorokuina telah dapat meredakan parasitemia dan memanjangkan tempoh kemandirian mencit yang terjangkit. Jadual 2 di bawah merumuskan hasil-hasil dalam kajian pertama iaitu mengenai kesan prarawatan.

Purata puncak parasitemia bagi kumpulan mencit kawalan positif (dijangkiti tetapi tidak dirawat) dan dua kumpulan mencit percobaan yang menerima rawatan tunggal garam ferosenium tidak banyak berbeza begitu juga tempoh kemandiriannya sekitar 8-9 hari dengan semua mencit mengalami maut (Jadual 2). Parasitemia bagi kumpulan ini juga didapati meningkat dengan cepat. Keadaan agak berlainan bagi dua lagi kumpulan mencit yang menerima rawatan campuran CQ-garam ferosenium. Walaupun rawatan dengan CQ-[Fc][SbCl₄] tidak menghalang kematian mencit tetapi parasitemianya meningkat lebih perlahan dan membolehkan mencit hidup sehingga 12 hari. Aktiviti antimalaria jelas ditunjukkan oleh rawatan campuran CQ-Fc⁺-SnCl₄ dimana terdapat hanya 16.7 kematian dan mencit yang pulih hidup melebihi 30 hari. Parasit tidak ditemui pada mencit yang menerima rawatan klorokuina dan semua mencit bermandiri lebih daripada 30 hari.

Dalam percobaan kedua, kesan rawatan garam ferosenium yang diberi secara pos- jangkitan menjelaskan lagi aktiviti antimalaria garam ini. Walaupun puncak parasitemia antara kumpulan kawalan positif, kumpulan rawatan dengan Fc⁺-SnCl₄ dan [Fc][SbCl₄] masing-masing tidak berbeza nyata ($p > 0.05$), tetapi parasitemia kumpulan rawatan ini meningkat lebih perlahan dan dengan itu berjaya memanjangkan tempoh kemandirian mencit walaupun semuanya maut (RAJAH 1). Dua kumpulan mencit yang menerima rawatan campuran klorokuina-garam ferosenium pula menunjukkan corak parasitemia yang lebih rendah. Kedua-dua kumpulan mencit yang menerima rawatan campuran klorokuina-Fc⁺-SnCl₄ dan [Fc][SbCl₄] menunjukkan corak parasitemia yang serupa sama ada selepas rawatan pertama (hari ke-6) maupun selepas rawatan kedua (hari ke-12). Dengan corak parasitemia begini tempoh kemandirian mencit menjadi lebih lama

iaitu sekitar 29 hari dengan puncak parasitemia mencit terawat dengan klorokuina-Fc⁺-SnCl₄ lebih rendah. Hasil percobaan ini mencadangkan bahawa ulangan rawatan dengan garam ferosenium mungkin lebih menunjukkan aktiviti antimalaria garam yang di uji.

Corak parasitemia pada mencit dalam percobaan ketiga (rawatan secara pos-jangkitan pada hari ke-6 dan diulang rawatan apabila parasitemia mencapai 20-30% iaitu sekitar hari ke-14; RAJAH 2) adalah hampir serupa dengan percobaan kedua tetapi dengan beberapa perbezaan yang ketara. Selepas rawatan pertama dengan campuran klorokuina-garam ferosenium, parasitemia terus menurun ke aras <10% pada hari ke-12 tetapi meningkat semula ke aras >20% pada hari ke-14 sebelum dirawat semula kali kedua. Akibat rawatan ini, parasitemia didapati menurun semula ke aras <10% pada hari ke-16, tetapi bagi kumpulan yang menerima klorokuina-[Fc][SbCl₄] parasitemianya mendadak naik ke aras >40% tiga hari berikutnya dan menyebabkan semua mencit maut. Parasitemia bagi kumpulan mencit yang menerima klorokuina-Fc⁺-SnCl₄ pula terus menurun semula setelah dirawat kali kedua ke aras <5% sehingga hari ke-21 sebelum meningkat semula secara perlahan-lahan dan membolehkan mencit hidup sekitar 29 hari. Parasitemia pada mencit kumpulan yang dirawat dengan klorokuina menunjukkan kelainan iaitu ia kurang berkesan pada rawatan kedua untuk menghapuskan parasitemia (RAJAH2) walaupun mencit dapat bertahan hidup lebih lama. Ini mencadangkan bahawa rawatan yang dilakukan apabila parasitemia melebihi 30% mungkin kurang berkesan dan tidak membantu pemulihan mencit daripada jangkitan malaria.

Hasil-hasil percobaan telah dapat menunjukkan secara tidak langsung bahawa garam ferosenium yang diuji iaitu Fc⁺-SnCl₄ dan [Fc][SbCl₄] mempunyai aktiviti antimalaria terhadap parasit malaria *P. berghei* yang dipelihara dalam mencit. Ini dilihat daripada kemampuan garam-garam ini meredakan parasitemia, memanjangkan tempoh kemandirian mencit yang dijangkiti walaupun tidak berjaya menyelamatkan mencit daripada maut.

Walaupun klorokuina lebih berkesan merencat parasitemia berbanding dengan rawatan

campuran klorokuina-garam ferosenium, namun kehadiran garam ferosenium masih lagi mampu meredakan jangkitan parasit dan didapati campuran klorokuina- Fc^+ - SnCl_4 lebih efektif berbanding klorokuina- $[\text{Fc}][\text{SbCl}_4]$. Ini mungkin menunjukkan struktur anion pada garam tersebut memainkan peranan dalam aktiviti. Mekanisme tindakan tentang aktiviti rawatan campuran ini masih tidak diketahui tetapi pengetahuan tentang sifat keafinan garam dan klorokuina terhadap parasit malaria yang terdapat dalam vakuol parasitoforus dalam sel darah merah perlulah diketahui. Kemungkinan juga aktiviti yang dilihat ini adalah berlandaskan struktur.

Kerintangan parasit malaria terhadap dadah antimalaria seperti klorokuina telah lama dikesan. Fenomena ini memberi tamparan hebat ke atas usaha memerangi dan mengawal malaria pada manusia. Oleh itu calon bahan antimalaria alternatif atau baru perlulah dicari. Biot et al. (1997) dan Dormale et al. (1998) telah menemukan analog klorokuina-ferosina (atau dikenali feroklorokuina) yang mempunyai aktiviti 5-20 kali lebih berkesan daripada klorokuina sendiri (Delhaes et al. 2001) untuk bertindak ke atas *P. falciparum* yang rintang terhadap klorokuina. Didapati perubahan struktur yang berlaku pada klorokuina dengan penambahan ferosena sebagai analog telah meningkatkan keafinan klorokuina terhadap parasit dan dengan itu lebih berkesan bertindak ke atasnya. Penukargantian rantai C pada struktur klorokuina kepada moiety ferosenil menjadikan feroklorokuina lebih efektif berbanding klorokuina (Biot et al. 1999a). Walaupun rawatan campuran klorokuina-garam ferosenium kurang berkesan bertindak ke atas *P. berghei* berbanding rawatan dengan klorokuina seperti yang didapati dalam kajian ini, namun dengan manipulasi struktur yang jika dilakukan dengan teratur mungkin membolehkan rawatan campuran ini lebih berkesan untuk memusnahkan parasit. Pendekatan ini haruslah diterokai bagi meninggikan peluang aplikasi garam ferosenium atau ferosena umumnya sebagai calon bahan antimalaria yang baru di pasaran.

4. Kesimpulan

Daripada percobaan yang dilakukan didapati semua garam ferosenium yang diuji adalah toksik terhadap dua bahan uji piawai yang digunakan iaitu larva nyamuk *A. albopictus* dan

udang pepai *A. salina* walaupun darjah ketoksikan garam-garam tersebut berbeza antara satu sama lain. Namun demikian ketoksikan garam ini jauh lebih rendah daripada ketoksikan garam kuprum. Dua daripada garam ini iaitu Fc^+SnCl_4 dan $[\text{Fc}][\text{SbCl}_4]$ secara tidak langsung telah menunjukkan aktiviti antimalaria terhadap malaria rodent *P. berghei* yang dipelihara dalam mencit.

5. Ucapan terima kasih

Penulis ingin merakamkan ucapan terima kasih khasnya kepada Universiti Kebangsaan Malaysia atas kelengkapan dan kemudahan yang disediakan bagi melaksanakan kajian ini.

6. Daftar pustaka

Biot, C., Clorian, G., Maciejewski, L.A., Brocard, J.S., Dormale, O., Blampain, C., Millet, P., George, A.S., Abessalo, H., Dive, D., Lebibi, J., (1997). Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* **40**, 3715-3718.

Biot, C., Delhaes, L., Abessalo, H., Dormale, O., Maciejewski, L.A., Mortuaire, M., Delcourt, P., Deloron, P., Camus, D., Dive, D., Brocard, J.S., (1999a). Novel metallocenic compounds as antimalarial agents. Study of the position of ferrocene in chloroquine. *J. Organomet. Chem.* **589**, 59-65.

Biot, D., Delhaes, L., N'Diaye, C.M., Maciejewski, L.A., Camus, D., Dive, D., Brocard, J.S., (1999b). Synthesis and antimalaria activity *in vitro* of potential metabolites of ferrochloroquine and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2843-2847.

Delhaes, L., Abessalo, H., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L.A., Brocard, J., Camus, D., Dive, D., (2001). *In vitro* and *in vivo* antimalaria activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine resistant malaria parasite. *Parasitol. Res.* **87**, 239-244.

Dormale, O., Blampain, G., Agnani, H., Nzadiyabi, T., Lebibi, J., Brocard, J., Maciejewski, L.A., Biot, C., Geroges, A.S., Millet, P., (1998). *In vitro* antimalarial activity of a new organometallic analogue, ferrocene-chloroquine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(3), 540-544.

Gregg, B.A., Heller, A., (1989). Enzyme Electrodes. *Patent: US4224125* 16 November 1993.

Hashim, N. (1999). Sintesis dan kajian kekonduksian sebatian ferosenium. Tesis Sarjana Sains, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Kopf-Maeir, P., Kopf, H., Neuse, E.W., (1984). Ferrocenium complexes: a new type of water-

soluble antitumor agent. *J. Cancer Res. Clin.Oncol.* **108**(3), 336-340.

Mallus, A., (1982). Mosquitoes. *Handbook of Pest Control*. Ed.6. hal. 690-715.

Nordin, N.I., (2003). Sintesis dan kajian ketoksikan dan aktiviti antimalaria beberapa garam ferosenium. Tesis Sarjana Sains, Universiti Kebangsaan Malaysia.

Nordin, N.I., Yamin, B.M., Tee, S.T., Abu Hasan, Z.A., Fun, H.K., Raj, S.S., Ibrahim, A.R., (2000). Penyediaan semula garam ferosenium-BiBr₃ dan kajian awal aktiviti antimalaria oleh Ferosenium-SnCl₄. *Prosiding Kimia Bersama ITB-UKM IV* 12-13 April hal. 592-599.

Osella, D., Ferrali, M., Zanello, P., Laschi, F., Fontani, M., Nervi, C., Cavigiolio, G., (2000). On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives. *Inorganica Chimica Acta* **306**, 42-48.

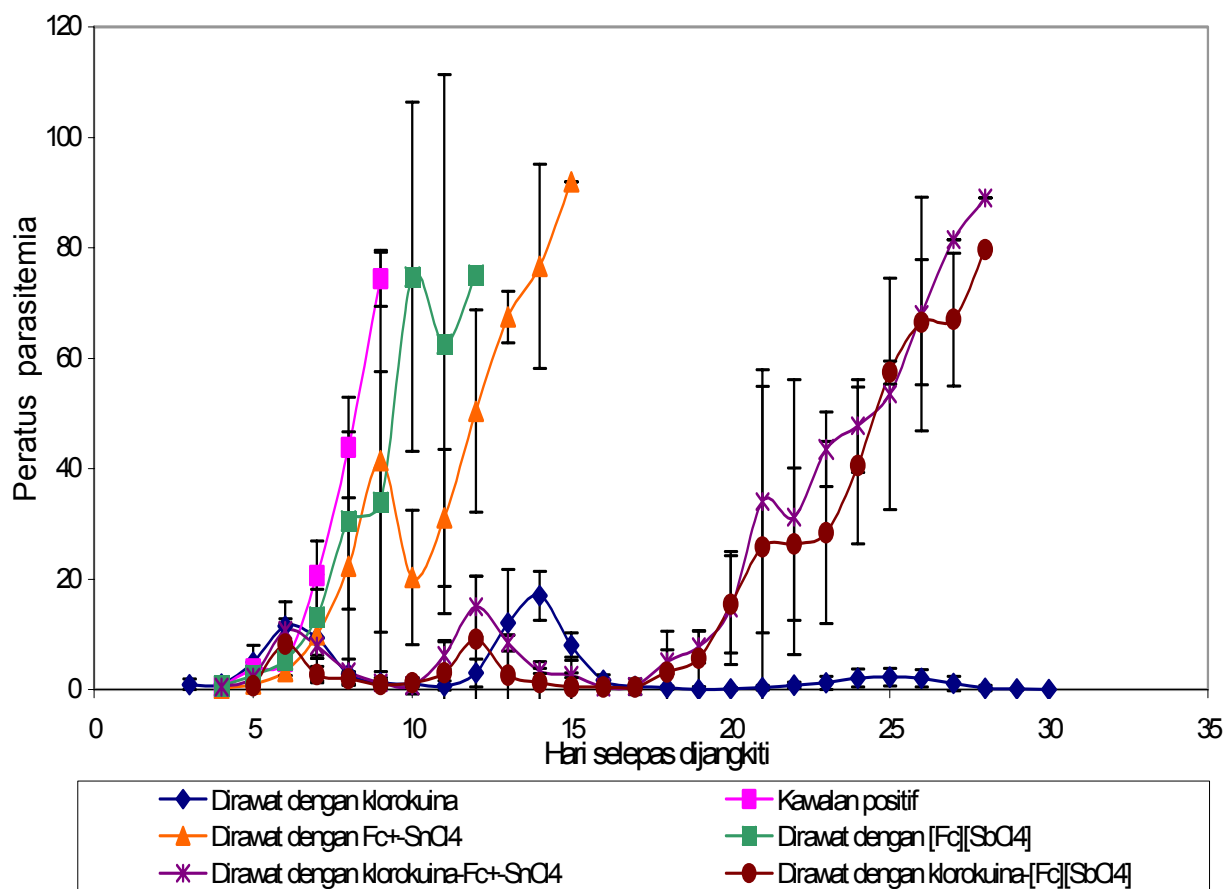
Romi, R. (1995). History and updating the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parasitologia* **37**, 99-103.

Romi, R., Lucas, M.D., Raineri, W., Pesce, M., Rey, A., Giovannangeli, S., Zanasi, F., Bella, A., (2000). Laboratory and field evaluation of metallic copper on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larval development. *J. Med. Entomol.* **37**(2), 281-285.

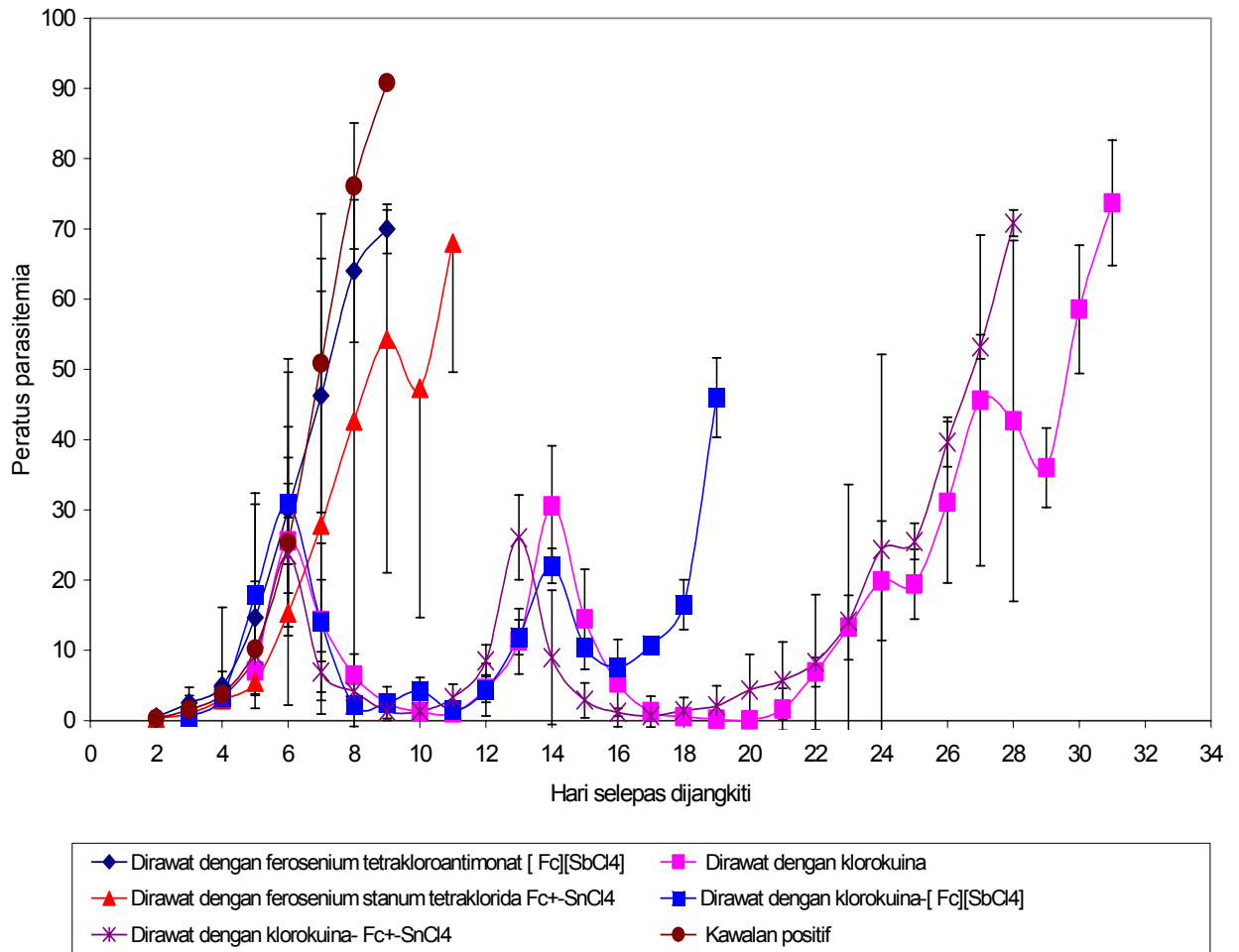
Sanchez-fortun, S., Sanz, F., Barahona, M.V., (1996). Acute toxicity of several organophosphorus insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2 PAM on *Artemia salina* larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 391-398.

Yamin, B.M., Fun, H.K., Sivakumar, K., Yip, B.C., Shawkataly, O., (1996). Ferrocenium tetrachloroantimonate. *Acta Crystallography* **C52**, 600-602.

Yamin, B.M., Boshala, A.M.H., Othman, A.H., Hashim, M. (1998). Crystal structure of ferrocenium-u-chloro-bis[dichlorodimethylstannate (IV)], C₁₄H₂₂Cl₅-FeSn. *Zeitschrift fur kristallographie* **213**, 515-516.



RAJAH 1. Perubahan peratus parasitemia bagi kumpulan mencit yang diberi rawatan ferosenium, klorokuina dan campuran klorokuina-ferosenium dengan nisbah 1:1 bagi percobaan kedua. Rawatan diberi sebanyak dua kali di sepanjang tempoh kajian.



RAJAH 2. Perubahan peratus parasitemia kumpulan mencit yang diberi rawatan ferosenium, klorokuina dan campuran klorokuina-ferosenium dengan nisbah 1:1 bagi percobaan ketiga. Rawatan diberi sebanyak dua kali sepanjang tempoh kajian.

JADUAL1. Tahap ketoksikan (purata % kematian) garam ferosenium dalam kesemua kepekatan terhadap larva nyamuk *A. albopictus* (A) dan udang pepai (*A. salina*) (B).

Garam Ferosenium	Purata % Kematian (A)	Purata % Kematian (B)
Fc-SnCl ₄	48.89 ^a	83.71 ^{ab}
[Fc][SbCl ₄]	65.56 ^a	57.81 ^{abc}
Fc-SbCl ₅	38.89 ^a	61.11 ^c
[(Fc)(BiBr ₄) ₄]	16.67 ^a	48.18 ^c
[Fc][BiCl ₄]	18.89 ^a	52.22 ^{bc}
Fc-ClO ₄	66.67 ^a	87.78 ^a
HClO ₄	33.33 ^a	88.89 ^a

a-c: turus dengan abjad yang sama tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan (p<0.05)

JADUAL 2. Rumusan hasil kajian mengenai kesan prarawatan garam ferosenium ke atas mencit terjangkit malaria.

Jenis Bahan Rawatan	Purata Puncak Parasitemia (%) dan Julat (hari)	Purata Tempoh Kemandirian Mencit (hari)	Kumulatif Kematian (%)
Klorokuina (CQ)	0.00 \pm 0.00 (1-30)	> 30	0.00
Kawalan positif	43.68 \pm 34.68 (5-10)	8.50 \pm 0.84	100.00
Fc ⁺ -SnCl ₄	41.24 \pm 27.36 (5-11)	9.33 \pm 1.37	100.00
[Fc][SbCl ₄]	50.85 \pm 39.80 (5-10)	8.83 \pm 0.98	100.00
CQ-Fc ⁺ -SnCl ₄	6.20 \pm 2.09 (12-22)	>30	16.70
CQ-[Fc][SbCl ₄]	48.0 \pm 16.97 (12-15)	11.9 \pm 1.97	100.00

Aktivitas antibakteri cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp.

Zeily Nurachman¹⁾, Fasade Miharja Beangi¹⁾, Saepurahman¹⁾

¹⁾Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia.
E-mail: zeily@chem.itb.ac.id

Abstrak

Cacing tanah sudah sejak lama digunakan untuk pengobatan, khususnya di dunia pengobatan tradisional. Berbagai penelitian melaporkan aktivitas antibakteri dan antipiretik cacing tanah. Pada penelitian ini, cairan selom cacing tanah Pheretima sp. diisolasi dengan cara perlakuan khusus (dipuasakan sehari dan direndam semalam sebelum pengambilan cairan selom) dan tanpa perlakuan khusus. Kemudian, aktivitas cairan selom diuji dengan metode difusi agar dan ditentukan kurva inhibisinya pada bakteri Escherichia coli, Bacillus megaterium, Staphylococcus aureus, Serratia marcescens dan Pseudomonas aeruginosa. Cairan selom dari cacing dengan perlakuan khusus memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif B. megaterium dan S. aureus; namun sangat sedikit aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif E. coli, S. marcescens dan P. aeruginosa. Sementara, cairan selom dari cacing tanpa perlakuan tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Aktivitas tertinggi sebagai anti-B. megaterium menghambat pertumbuhan bakteri sebesar $6,6 \times 10^7$ sel/mg protein setelah diinkubasi (37 °C, 4 jam).

Kata kunci: antimikroba, cacing tanah, cairan selom, *Pheretima* sp.

1. Pendahuluan

Saat ini antibiotik telah digunakan secara luas untuk mengobati berbagai penyakit infeksi bakteri patogen. Namun, penggunaan antibiotik seringkali tidak sesuai akibat dianggap sebagai obat bebas (Eng et al., 2003). Jika bakteri patogen tahan terhadap antibiotik, maka obat ini tidak berguna dalam mengobati penyakit infeksi. Solusi yang diperlukan untuk memerangi penyakit akibat resistensi bakteri tidak hanya menemukan antibiotik baru tetapi juga menemukan jenis penyakit infeksi baru.

Cacing tanah mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan buruk, termasuk lingkungan sangat kotor yang mengandung banyak bakteri dan kuman penyakit. Justru di lingkungan tersebut cacing tanah berkembang biak dengan subur seperti di daerah yang memiliki banyak sampah organik. Untuk bertahan hidup pada daerah seperti itu, tentunya diperlukan ketahanan tubuh untuk menoleransi bakteri-bakteri patogen. Berbagai penelitian melaporkan adanya aktivitas antibakteri dari cairan selom pada berbagai cacing tanah seperti

Eisenia fetida andrei (Milochau et al., 1996), *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998), dan *Diversi color* (Deloffre et al., 2003).

Setelah berevolusi selama 700 juta tahun cacing berhasil bertahan dalam lingkungan ekstrim dan tetap eksis sampai sekarang. Di masyarakat, tepung cacing tanah telah banyak digunakan sebagai obat penyakit demam tifoid, terutama dalam ramuan obat-obatan Cina. Namun, penelitian intensif mengenai senyawa-senyawa aktif dalam cacing terhadap bakteri patogen belum banyak dilakukan, khususnya di Indonesia.

Kenyataan di atas mendorong untuk meneliti senyawa-senyawa antibakteri dari cacing. Hal ini didukung oleh dua alasan. Pertama, cacing merupakan organisme yang mudah diternakkan dengan biaya murah, cacing tumbuh subur di tempat sampah dan tidak memerlukan perlakuan khusus yang mahal. Selain itu, sampah merupakan satu masalah di kota-kota besar. Kedua, di Indonesia dan negara berkembang lain, penyakit infeksi merupakan

penyebab kematian terbesar, hingga mencapai lebih dari 45% setiap tahunnya (Rossamund, 2000). Penyakit infeksi tersebut antara lain penyakit demam tifoid, penyakit saluran pernafasan, tuberkulosis dan malaria. Sebagian besar orang yang meninggal akibat penyakit-penyakit tersebut tidak tertolong karena alasan ekonomi. Padahal jika kita melihat ke sekeliling, cacing adalah sumber bahan baku obat potensial yang murah dan mudah diperoleh.

Pada penelitian ini kami melaporkan aktivitas antibakteri cacing tanah lokal *Pheretima* sp.

2. Percobaan

2.1. Cacing tanah, mikroba uji, dan isolasi cairan selom

Cacing tanah *Pheretima* sp. diperoleh dari peternakan cacing lokal (OSA, Bandung), sedangkan bakteri yang digunakan adalah *E. coli*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *S. marcescens* dan *P. aeruginosa* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung, Bandung.

Cairan selom diisolasi dari cacing tanah dengan metode yang dijelaskan sebelumnya (Lassalle et al., 1988). Singkatnya, 50 gr cacing dibersihkan, dikeringkan di atas kertas halus, dan distimulasi dengan listrik bertegangan 6V untuk menginduksi kontraksi dan ekstrusi cairan selom melalui pori-pori dorsal permukaan kulit. Cairan selom dikumpulkan, dan disentrifuga 10000g selama 10 menit pada 4°C. Supernatan (cairan selom) dikumpulkan, disaring menggunakan kertas filter 0.2 µm steril, dan digunakan selagi segar.

2.2. Pertumbuhan bakteri uji

Semua galur bakteri ditanam dalam medium Luria Bertani (LB) dengan komposisi 1 g NaCl, 1 g tripton bakter, dan 0,5 g ekstrak ragi dalam 100 ml aquades pada suhu 37°C. Pertumbuhan eksponensial bakteri diamati dari nilai kerapatan optik pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) dengan nilai antara 0,2–1,0. Sementara media padat agar mengandung komposisi nutrisi yang sama dan ditambah agar dengan konsentrasi akhir 15 g/l). Untuk menyiapkan piring agar, 50 µl kultur segar bakteri uji ditambahkan ke dalam 10 ml medium agar leleh, divortex, dan dituang ke cawan Petri steril. Piring-piring agar disiapkan segera sebelum pemakaian.

2.3. Unit pembentuk koloni (CFU)

Karena pertumbuhan bakteri pada fasa eksponensial adalah linear, dari Hukum Beers, OD_{600} berbanding lurus dengan konsentrasi sel bakteri (CFU/ml). Nilai CFU ditentukan dengan tahap berikut. Kultur bakteri uji yang ditumbuhkan hingga OD_{600} sekitar 0,6 dilarutkan dengan medium LB secara seri dengan konsentrasi antara 10^0 – 10^8 kali lebih encer. Satu ml masing-masing kultur ditebar di atas permukaan agar, dan jumlah CFU dihitung setelah inkubasi piring agar diinkubasi 37°C selama 18 jam.

2.4. Uji aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri cairan selom ditentukan secara kualitatif melalui metode difusi agar (Bauer et al., 1966). Singkatnya, 30 µl cairan selom ditotolkan di atas permukaan kertas cakram berdiameter 0,6 mm. Kertas cakram dipindah ke piring agar dan diinkubasi 37°C selama 16 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dari daerah bening sekitar kertas cakram. Sebagai pembanding positif, digunakan antibiotik amoksisilin.

Secara kuantitatif, aktivitas antibakteri cairan selom diukur dari penurunan laju pertumbuhan bakteri uji. Laju pertumbuhan bakteri uji pada fasa eksponensial didefinisikan oleh lereng dari bagian linear kurva pertumbuhan bakteri, dan perubahan OD_{600} per menit sebanding dengan CFU/ml/min. Satu ml sampel cairan selom ditambahkan ke medium bakteri uji dengan OD_{600} sekitar 0,1. Biakan diinkubasi pada 37°C dengan kecepatan agitasi 150 rpm, dan nilai OD_{600} diamati dalam interval waktu 30 menit. Sebagai kontrol, cairan selom diganti dengan aquades. Laju pertumbuhan bakteri ditentukan dari lereng kurva pertumbuhan bakteri pada fasa eksponensial.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pertumbuhan bakteri uji

Pola pertumbuhan bakteri dimulai dari fasa adaptasi, fasa pertumbuhan, fasa stasioner, dan diakhiri dengan fasa kematian. Pada fasa pertumbuhan, disebut juga fasa eksponensial, jumlah sel bakteri bertambah dengan pesat. Karakteristik bakteri uji ditunjukkan pada **Tabel 1**, dan fasa pertumbuhan teramati pada nilai OD_{600} antara 0,2 dan 1,0. Pada kondisi ini telah ditentukan waktu pembelahan bakteri, dan hasilnya *B. megaterium* dan *S. Marcescens* berturut-turut memiliki waktu pembelahan paling cepat dan paling lambat. Pada

3.2 Aktivitas antibakteri

Uji difusi agar terhadap *E. coli* dilakukan menggunakan antibakteri amoksisilin dan cairan selom. **Gambar 2a** menunjukkan daerah bening luas sekitar cakram yang menunjukkan amoksisilin dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*. Tetapi, daerah bening tidak ditunjukkan di sekitar cakram cairan selom, baik untuk cacing tanpa dan dengan perlakuan khusus. Jadi, *E. coli* sensitif terhadap amoksisilin tetapi tidak sensitif terhadap cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp.

Uji difusi agar terhadap *B. megaterium* menunjukkan daerah bening di sekitar cakram

amoksisilin dan cairan selom cacing dengan perlakuan khusus yang tidak ditunjukkan cairan selom cacing tanpa perlakuan khusus (**Gambar 2b**). Hal ini menunjukkan *B. megaterium* sensitif terhadap amoksisilin cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp. dengan perlakuan khusus tetapi tidak sensitif terhadap cairan selom caing tanpa perlakuan khusus.

Uji difusi agar terhadap *S. aureus* menunjukkan daerah bening untuk amoksisilin dan dan cairan selom cacing dengan perlakuan khusus yang tidak ditunjukkan cairan selom cacing tanpa perlakuan khusus (**Gambar 2c**). Hal ini menunjukkan *S. aureus* sensitif terhadap

Tabel 1. Karakteristik bakteri uji.

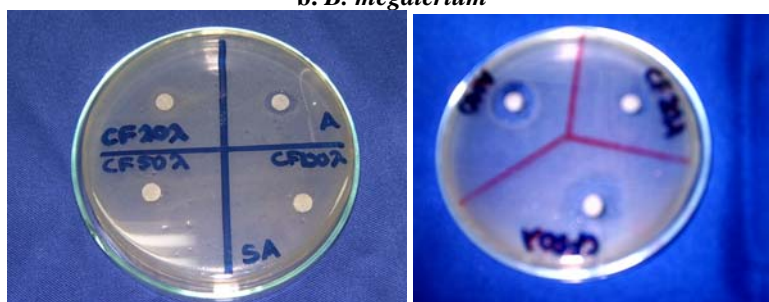
Bakteri uji	OD ₆₀₀ fasa eksponensial	Waktu generasi (menit)	CFU/ml pada OD ₆₀₀ =0,6
<i>E. coli</i>	0,2 – 1,0	39	$1,85 \times 10^9$
<i>B. megaterium</i>	0,3 – 1,0	32	$3,47 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	0,3 – 1,0	46	$2,03 \times 10^8$
<i>S. marcescens</i>	0,4 – 1,2	64	$2,40 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	0,4 – 1,0	41	$3,02 \times 10^8$



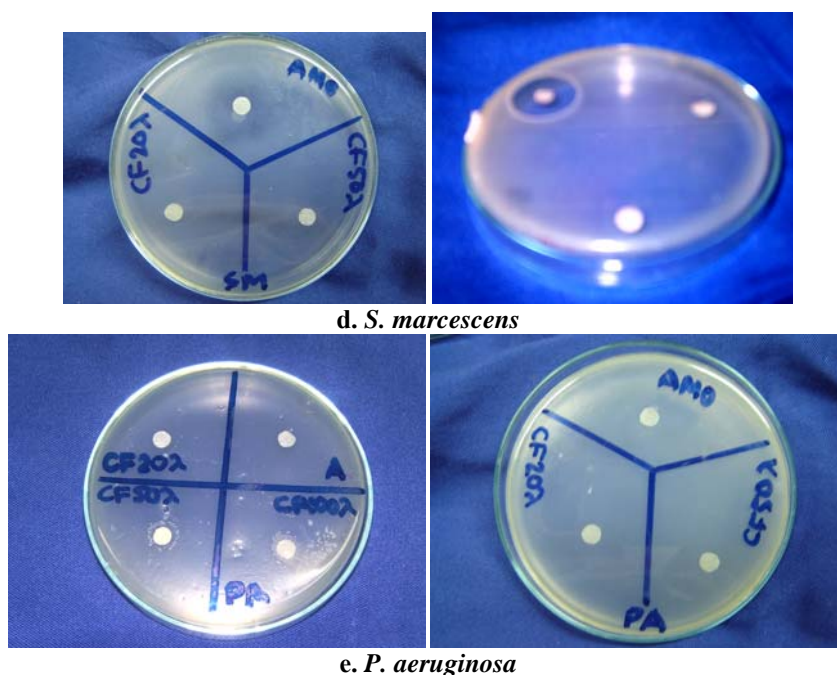
a. *E. coli*



b. *B. megaterium*



c. *S. aureus*



Gambar 2. Aktivitas antibakteri cairan selom cacing (tanpa perlakuan khusus, kiri; dan dengan perlakuan khusus, kanan)

amoksisilin dan cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp. dengan perlakuan khusus tetapi tidak sensitif terhadap cairan selom cacing tanpa perlakuan khusus.

Uji difusi agar terhadap *S. marcescens* menunjukkan daerah bening luas sekitar cakram amoksisilin tetapi tidak di sekitar cakram cairan selom, baik untuk cacing tanpa dan dengan perlakuan khusus (**Gambar 2d**). Hal ini menunjukkan *S. marcescens* sensitif terhadap amoksisilin tetapi tidak sensitif terhadap cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp.

Uji difusi agar terhadap *P. aeruginosa* menunjukkan tidak ada daerah bening di sekitar cakram amoksisilin dan cairan selom, baik untuk cacing tanpa dan dengan perlakuan khusus (**Gambar 2e**). Hal ini menunjukkan *P. aeruginosa* tidak sensitif terhadap amoksisilin dan cairan selom cacing tanah *Pheretima* sp.

Amoksisilin diketahui memiliki spektrum aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan cara inhibisi pertumbuhan dinding sel bakteri pada saat pertumbuhan peptidoglikan dan penyusunan murein. Uji difusi agar menunjukkan amoksisilin memiliki aktivitas antibakteri positif pada *B. megaterium*, *S. aureus*; *E. coli*,

dan *S. marcescens* tetapi tidak memiliki aktivitas pada *P. aeruginosa*.

Cairan selom cacing yang tidak mengalami perlakuan khusus tidak memiliki aktivitas antibakteri pada semua bakteri uji. Sedangkan uji difusi agar pada cairan selom cacing yang menerima perlakuan khusus menunjukkan aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif, yaitu *B. megaterium* dan *S. aureus*; tetapi tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif, yaitu *E. coli*, *S. marcescens* dan *P. aeruginosa*. Jadi, cairan selom memiliki spektrum aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif.

Dinding sel bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan tebal sedangkan bakteri Gram negatif lapisan peptidoglikan tipis namun memiliki membran luar dan daerah cairan periplasma yang tebal yang diperkirakan dapat menghalangi senyawa antibakteri yang terdapat dalam cairan selom untuk menembus dinding sel bakteri Gram negatif sehingga tidak dapat menghancurkan sel. Kemungkinan lain, senyawa antibakteri dalam cairan selom dapat menembus membran namun dapat berinteraksi dengan enzim atau protein yang banyak terdapat dalam daerah cair periplasma sehingga menjadi tidak aktif. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk penentuan dan pemurnian

senyawa antibakteri yang terdapat dalam cairan selom serta mekanismenya pada sel bakteri.

Karena *B. megaterium* adalah bakteri Gram positif, dengan dinding selnya lebih tipis, diperkirakan bahwa aktivitas anti-*B. megaterium* disebabkan komponen dalam cairan selom dapat berpenetrasi melewati dinding sel. Uji kuantitatif dengan menggunakan volume cairan selom 5% (v/v) yang berkadar protein 25,5 mg/ml menunjukkan aktivitas antibakteri secara signifikan. Besar aktivitas hambat pertumbuhan *B. megaterium* setelah diinkubasi pada 37°C selama 4 jam adalah $6,6 \times 10^7$ sel/mg.

4. Kesimpulan

Cairan selom cacing tanah memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif *B. megaterium* dan *S. aureus*, dan sedikit pada bakteri Gram negative *E. coli*, *S. marcescens* dan *P. aeruginosa*.

5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung secara finansial oleh Departemen Pendidikan Nasional, melalui Hibah Bersaing.

6. Daftar Pustaka

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk methods. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493–496.

Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., Kim, S.C., (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1408**, 67–76.

Deloffre, L., Salzet, B., Vieau, D., Andries, J.C., Salzet M., (2003). Antibacterial properties of hemerythrin of the sandworm *Nereis diversicolor*. *Neuroendocrin. Lett.*, **24**, 39–45.

Eng, J.V., Marcus, R., Hadler, J.L., Imhoff, B., Vugia, D.J., Cieslak, P.R., Zell, E., Deneen, V., McCombs, K.G., Zansky, S.M., Hawkins, M.A., Besser, R.E., (2003). Consumer Attitudes and Use of Antibiotics, *Emerging Infect. Diseases J.*, **9**, 582–591.

Lassalle, F., Lassegues, M., Roch, Ph., 1988. Protein analysis of earthworm coelomic fluid –IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (annelidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **B91**, 187–192.

Milochau, A., Lassegues, M., Valembois, P., (1996). Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 123–132.

Rosamund, W., (2000). Antimicrobial resistance: the facts. *Essential Drugs Monitor*, **28 & 29**:7–8.

Isolasi Trimiristin dari Limbah Hasil Pengolahan Minyak Pala

Zuhrina Masyithah

Program Studi Magister Teknik Kimia, Program Pascasarjana USU
Jl. Sivitas Akademika Kampus USU, Medan 20155, Tel. (061)8212453
email: zuhrina@yahoo.com

Abstrak

Limbah hasil pengolahan minyak pala sampai saat ini belum dikelola dan dimanfaatkan secara baik, padahal limbah pala masih mengandung trimiristin yang bernilai ekonomis. Untuk menghasilkan rendemen trimiristin yang tinggi, pengolahan limbah pala dipengaruhi tiga parameter utama yaitu jenis pelarut, konsentrasi pelarut dan variasi waktu perlakuan. Dipilih tiga jenis pelarut yaitu benzene, n-heksane dan kloroform pada variasi konsentrasi 37%, 65%, 75% dan 98% serta waktu ekstraksi dari 6 hingga 12 jam. Isolasi trimiristin dilakukan secara sokletasi menggunakan pelarut yang bervariasi dan diikuti dengan kristalisasi menggunakan pelarut etanol. Campuran kristal disaring dan dilakukan analisa terhadap kristal trimiristin yang terbentuk. Dari hasil pengamatan disimpulkan bahwa jenis pelarut, konsentrasi pelarut dan waktu operasi mempengaruhi hasil ekstraksi yang diperoleh. Pada rentang pengamatan yang dilakukan diperoleh bahwa benzene merupakan jenis pelarut yang terbaik. Peningkatan konsentrasi benzene dan waktu ekstraksi akan meningkatkan rendemen trimiristin. Rendemen trimiristin yang diperoleh adalah sebesar 21,6% dengan kandungan trimiristin berdasarkan hasil analisa KGC sebesar 89,86% serta titik lebur 54,5^oC.

Kata kunci: limbah pala, jenis dan konsentrasi pelarut, trimiristin, waktu ekstraksi.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara penghasil pala nomor satu di dunia. Tanaman pala dengan istilah latin *Myristica fragrans houtt* adalah salah satu dari tanaman penghasil minyak atsiri yang lebih kita kenal dengan sebutan minyak pala (Rismunandar, 1988). Salah satu cara pengolahan minyak pala adalah dengan cara distilasi uap terhadap serbuk kering bii pala. Hasil pengolahan minyak pala dengan cara ini menghasilkan limbah yang belum dimanfaatkan secara potensial hingga saat ini.

Dari hasil analisa komposisi senyawa kimia terhadap limbah pengolahan minyak pala diperoleh bahwa limbah tersebut kaya akan senyawa trigliserida yaitu trimiristin. Dengan mengisolasi trimiristin disertai dengan amidasi menggunakan senyawa amoniak maka akan diperoleh amida asam lemak yang selanjutnya dapat digunakan sebagai surfaktan.

Pemanfaatan trimiristin yang terdapat pada

limbah hasil pengolahan minyak pala untuk ditransformasikan menjadi miristimida telah dilakukan oleh Indra *et al.* (1999), dengan mengisolasi limbah pala dengan pelarut n-heksane yang menghasilkan rendemen trimiristin sebesar 23%. Berdasarkan hasil yang didapat tersebut, ingin dilanjutkan kajian untuk memperoleh trimiristin dengan menggunakan variasi jenis dan konsentrasi pelarut.

2. Percobaan

Penyediaan Bahan Baku

Buah pala yang telah dipisahkan dari cangkangnya diblender halus, dikeringkan lalu didestilasi uap dengan Petroleum Eter. Hasil destilat adalah minyak atsiri dari pala, sedangkan ampas yang tertinggal adalah limbah pala. Limbah yang diperoleh dikeringkan dalam oven sampai diperoleh berat yang konstan.

Isolasi Trimiristin

Trimiristin dalam limbah pala diisolasi secara

sokletasi menggunakan berbagai variasi pelarut. Ekstrak yang diperoleh berupa campuran pelarut dan trimiristin kemudian dipisahkan lebih lanjut dengan rotary evaporator. Hasil ekstrak murni yang diperoleh dari rotari evaporator dilarutkan dalam etanol panas, kemudian didinginkan hingga terbentuk kristal trimiristin.

3. Hasil dan Pembahasan Pengaruh Konsentrasi

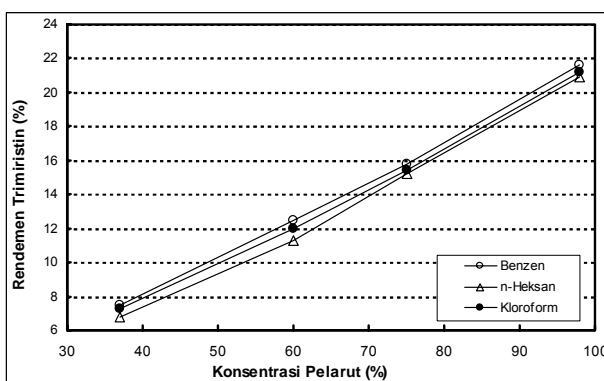
Hasil analisa sampel menggunakan pelarut n-heksane, benzene dan kloroform pada variasi konsentrasi 37%, 60%, 75% dan 98%; variasi volume pelarut 150, 200, 250 ml serta waktu ekstraksi 6, 9 dan 12 jam dipaparkan pada Gambar 1 hingga 6. Gambar 1 menunjukkan pengaruh konsentrasi terhadap perolehan trimiristin, dimana terlihat bahwa benzene menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan pelarut lain yaitu 21,6% pada konsentrasi 98%. Hal ini disebabkan karena benzene mempunyai sifat yang lebih stabil dibandingkan pelarut lainnya. Selain itu

benzene lebih selektif dalam melarutkan zat dan dalam prosesnya menghasilkan sejumlah kecil lilin albumen dan zat warna.

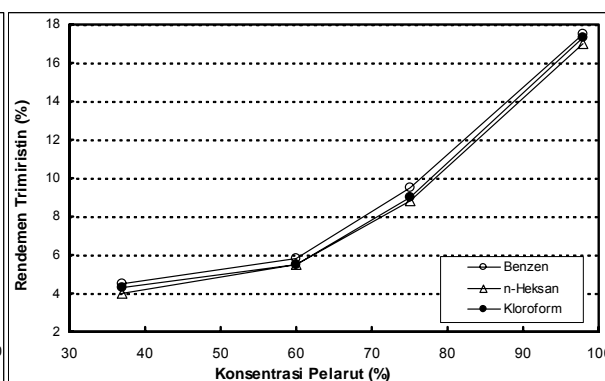
Untuk konsentrasi 60%, rendemen yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut benzene cukup jauh berbeda dengan pelarut lain dengan konsentrasi yang sama, sedangkan untuk konsentrasi 75% rendemen yang dihasilkan untuk tiap pelarut hanya berbeda sedikit. Gambar 2 juga menunjukkan bahwa pelarut benzene pada konsentrasi 60% hingga 98% meningkatkan rendemen trimiristin yang sangat signifikan jika dibandingkan dengan pada penggunaan konsentrasi pelarut kurang dari 60%.

Pengaruh Waktu Ekstraksi

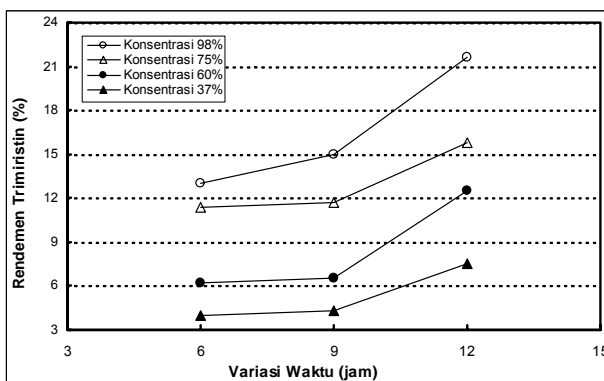
Waktu ekstraksi dimulai pada saat masuknya limbah minyak pala ke dalam sokletasi dan tungku pemanas dihidupkan. Hasil pengamatan pada Gambar 3 dan 4 menunjukkan bahwa jika waktu ekstraksi diperpanjang maka rendemen yang dihasilkan



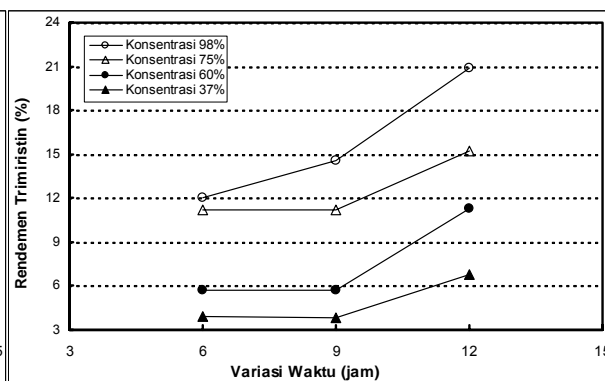
Gambar 1. Pengaruh Konsentrasi terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada volume pelarut 250 ml dan waktu ekstraksi 12 jam



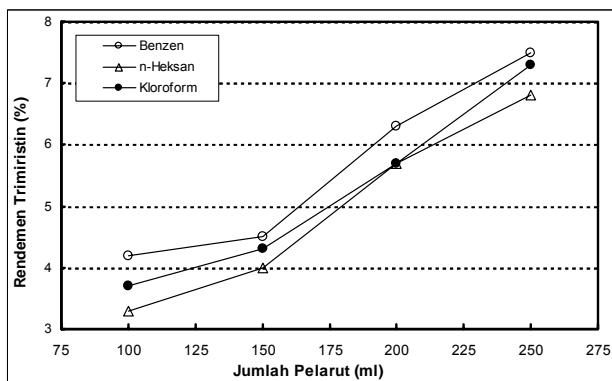
Gambar 2. Pengaruh Konsentrasi terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada volume pelarut 150 ml dan waktu ekstraksi 12 jam



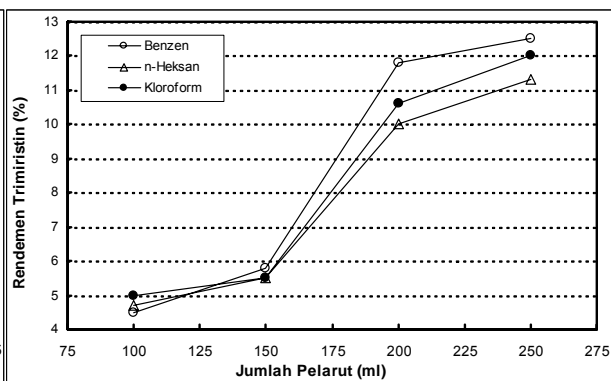
Gambar 3. Pengaruh Variasi Waktu terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada volume pelarut 250 ml Benzene



Gambar 4. Pengaruh Variasi Waktu terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada volume pelarut 250 ml n-Heksane



Gambar 5. Pengaruh Jumlah Pelarut terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada Konsentrasi 37%



Gambar 6. Pengaruh Jumlah Pelarut terhadap Trimiristin yang dihasilkan pada Konsentrasi 60%

akan semakin besar. Untuk proses ekstraksi selama 12 jam pada konsentrasi 98% dihasilkan rendemen sebanyak 21,6%. Hasil ini jauh lebih baik dibandingkan pada saat waktu ekstraksi 9 jam (15%) dan 6 jam (13%) untuk konsentrasi yang sama. Waktu ekstraksi yang lebih panjang memberi kesempatan pada pelarut yang digunakan untuk mengambil sebagian besar trimiristin yang terdapat dalam limbah hasil pengolahan minyak pala.

Pengaruh Volume Pelarut

Peningkatan jumlah penggunaan pelarut juga turut meningkatkan rendemen trimiristin yang dihasilkan. Gambar 5 menunjukkan bahwa 250 ml pelarut benzene menghasilkan rendemen yang lebih besar daripada pelarut n-heksane dan kloroform pada konsentrasi yang sama. Sementara untuk jumlah pelarut 200 ml, n-heksane dan kloroform mempunyai rendemen yang sama besar. Hasil yang sama diperoleh pada Gambar 6. Perbedaan rendemen yang diperoleh pada jumlah pelarut 250 ml dan 200 ml dengan menggunakan pelarut benzene cukup signifikan dibandingkan dengan menggunakan pelarut lain dengan volume pelarut yang sama. Gambar 6 juga menunjukkan bahwa peningkatan volume pelarut juga turut meningkatkan rendemen trimiristin.

Kadar Trimiristin

Kadar trimiristin yang terkandung dalam kristal yang diperoleh dapat dilihat melalui alat kromatografi. Untuk hasil optimum yang

diperoleh, kadar trimiristin yang dihasilkan adalah 89,86%.

Titik Lebur

Titik lebur rata-rata dari trimiristin yang dihasilkan adalah 54,5°C. Hasil ini sesuai dengan literatur dimana rentang titik lebur trimiristin adalah 54-55°C pada 1 atm (Memphis and Tennessee, 1964).

4. Kesimpulan

Dari hasil analisa dan pembahasan penelitian dapat disimpulkan bahwa jenis pelarut yang digunakan menentukan hasil ekstraksi. Pelarut benzene menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan pelarut n-heksane dan kloroform. Kemurnian pelarut juga menentukan hasil ekstraksi, dimana semakin murni suatu pelarut yang digunakan maka rendemen trimiristin akan semakin besar. Hal yang sama juga dijumpai pada penambahan waktu ekstraksi.

5. Daftar Pustaka

Indra S., Mimpin G., Firman S., (1999). Pemanfaatan Trimiristin yang Terdapat dalam Limbah Hasil Pengolahan Minyak Pala untuk Ditransformasikan menjadi Miristimida, *Majalah Universitas Sumatera Utara*, 1(2), 38-43.

Memphis S., Tennessee W., (1964). Fatty Amides Their Properties and Applications, Humko Produk Chemical Division National Products Corp., California.

Rismunandar, (1988). Budidaya dan Tata Niaga Pala, Penerbit Swadaya, Jakarta.

Elektroda Pasta Karbon yang Dimodifikasi dengan Xilenol Oranye untuk Analisis Timbal

Indra Noviandri¹⁾, Francisca N. Liman¹⁾

¹⁾ Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha No 10 Bandung, 40132, Indonesia
e-mail: innov@chem.itb.ac.id

Abstrak

Pada penelitian ini elektroda pasta karbon yang dimodifikasi dengan xilenol oranye (XO) telah dikembangkan untuk analisis ion Pb^{2+} di dalam beberapa matriks air. Xilenol oranye menunjukkan kemampuan untuk mengakumulasi ion Pb^{2+} lebih banyak di permukaan elektroda sehingga pengukuran menjadi lebih sensitif. Elektroda ini memiliki daerah linier hingga konsentrasi ion Pb^{2+} terendah 1 ppb. Kebolehulangan pengukuran elektroda sangat baik dengan standar deviasi pengukuran 6,5%. Analisis spike sampel dalam matriks air laut, air sungai dan air mineral menunjukkan bahwa elektroda ini memberikan akurasi pengukuran yang sangat baik dengan persen perolehan kembali berkisar antara 97 – 103 % pada daerah konsentrasi ion Pb^{2+} antara 0,01 – 10 ppm. Akurasi pengukuran sedikit berkurang pada konsentrasi yang lebih rendah.

Kata kunci: voltametri, timbal, xilenol oranye, pasta karbon, elektroda

1. Pendahuluan

Timbal adalah salah satu logam berat yang keberadaannya dilindungi diharapkan sekecil mungkin karena paparan timbal dapat berpengaruh buruk pada sistem saraf dan reproduksi manusia. Sebagai ilustrasi bahaya paparan timbal pada manusia, standar air minum WHO mensyaratkan kadar timbal dibawah 10 ppb. Oleh karena itu diperlukan metode analisis timbal yang sangat sensitif untuk memantau keberadaan timbal di lingkungan.

Salah satu metoda analisis yang dapat digunakan untuk penentuan timbal dalam kadar ultra renik adalah metoda *anodic stripping voltammetry* (ASV) menggunakan elektroda raksa. Elektroda raksa memungkinkan terjadinya proses pemekatan logam secara elektrolisis di permukaan elektroda karena raksa dapat melarutkan logam-logam dengan baik. Akibat proses pemekatan ini, analisis ion-ion logam dengan metoda ASV menjadi sangat sensitif. Untuk menghindari bahaya yang dapat ditimbulkan oleh raksa, banyak penelitian

diarahkan untuk mengembangkan elektroda alternatif yang bebas raksa [Yuan *et al.* (2004); Demetriades *et al.* (2004); Brainina *et al.* (2004); Yantasee *et al.* (2004); Ouangpipat *et al.* (2004)]. Penelitian umumnya difokuskan pada pemanfaatan ligan-ligan pengkompleks sebagai zat pemodifikasi permukaan elektroda. Ligan-ligan yang diteliti dapat mengkomplekskan ion logam analit sehingga memungkinkan terjadinya pemekatan ion-ion logam di permukaan elektroda.

Xilenol oranye umum digunakan sebagai indikator pada titrasi kompleksometri ion Pb^{2+} karena kemampuannya untuk mengkomplekskan ion Pb^{2+} . Zaporozhets *et al.* (2002) memanfaatkan xilenol oranye yang teradsorpsi pada permukaan silika sebagai reagen padat untuk penentuan timbal secara spektroskopi. Ini menunjukkan bahwa xilenol oranye yang terserap pada permukaan elektroda masih mampu mengkomplekskan ion Pb^{2+} . Dengan memanfaatkan kemampuan xilenol oranye ini maka pada penelitian ini xilenol oranye yang terserap pada permukaan silika

akan digunakan sebagai pemodifikasi elektroda pasta karbon untuk analisis ion Pb^{2+} secara anodic stripping voltametri.

2. Percobaan

Zat Kimia: Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah $Pb(NO_3)_2$ (Fluka 99,99%), HNO_3 (Merck 65%), parafin padat (Merck), grafit (Fisher 99,99%), silika gel (Merck 99%), xilenol oranye (Merck 99%). Zat-zat ini digunakan tanpa pemurnian lebih lanjut. Air ekstra murni dengan hambatan jenis $18,2 M\Omega\text{-cm}$ diperoleh melalui pemurnian aquades dengan alat pemurni air Barnsted.

Peralatan dan metode: Pengukuran voltametri dilakukan dengan potensiostat ADInstrument dengan sistem tiga elektroda yang dilengkapi dengan A/D converter Powerlab 400 dan *E-chem Basic Program* untuk pengolahan data. Elektroda pembanding dan elektroda pembantu yang digunakan berturut-turut adalah $Ag/AgCl$ ($NaCl$ 3 M) dan kawat platina. Pengukuran dilakukan dengan teknik *square wave anodic stripping voltammetry* (SWASV).

Pembuatan Elektroda: Silika gel (SG) direndam di dalam larutan xilenol oranye (XO) 0,001 M ($pH = 1$) dengan perbandingan berat(g)/volume(mL) 1: 50 selama 90 menit sambil diaduk. Silika gel yang telah menyerap xilenol oranye (SXO) dipisahkan secara dekantasi dan dikeringkan pada $60^\circ C$ selama 4 jam. Pada pembuatan elektroda pasta karbon, SXO dicampur dengan grafit dan parafin dengan perbandingan tertentu. Elektroda ini selanjutnya disebut dengan elektroda SXO. Untuk studi perbandingan, juga dibuat elektroda pasta karbon yang dimodifikasi hanya dengan silika gel. Elektroda ini selanjutnya disebut dengan elektroda SG. Pada pembuatan elektroda, komposisi parafin dibuat tetap 30% w/w sementara komposisi SXO, SG dan grafit dibuat bervariasi.

3. Hasil dan pembahasan

Pengaruh xilenol oranye: Untuk mempelajari pengaruh XO terhadap peningkatan sensitifitas pengukuran ion Pb^{2+} dengan metode ASV, larutan standar Pb^{2+} 1 ppm dianalisis dengan elektroda SXO dan SG dengan berbagai komposisi. Kurva antara arus stripping dan komposisi SXO dan SG pada elektroda ditunjukkan pada Gambar 1.

Hampir pada semua komposisi pasta karbon yang dipelajari arus stripping yang diperoleh dengan elektroda SXO lebih tinggi dari elektroda SG. Hal ini menunjukkan bahwa XO dapat meningkatkan akumulasi ion Pb^{2+} pada permukaan elektroda. Arus maksimum diperoleh pada komposisi SXO 30%. Elektroda dengan komposisi ini selanjutnya digunakan pada proses karakterisasi berikut.

Kebolehlulangan pengukuran: Untuk mempelajari kebolehlulangan pengukuran, larutan Pb^{2+} 1 ppm diukur berulang sebanyak 20 kali dengan kondisi pengukuran yang sama. Arus puncak yang diperoleh pada pengukuran berulang yang dilakukan dengan elektroda SXO dan SG ditunjukkan pada Gambar 2.

Deviasi standar relatif pada pengukuran berulang dengan elektroda SXO dan SG berturut turut adalah 6,5 dan 6,3 %. Nilai ini menunjukkan bahwa kedua elektroda cukup baik untuk digunakan pada pengukuran ion Pb^{2+} .

Kurva kalibrasi: Daerah kerja elektroda dipelajari dengan membuat kurva kalibrasi pada daerah konsentrasi Pb^{2+} antara 0,001-0,01 ppm. Kurva kalibrasi dibuat pada empat daerah konsentrasi yaitu 0,001-0,01 ppm; 0,01-0,1 ppm; 0,1-1 ppm dan 1-10 ppm. Tipikal kurva kalibrasi yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 3

Elektroda SXO dapat mengukur ion Pb^{2+} hingga konsentrasi 1 ppb sedangkan elektroda SG hanya dapat mengukur ion Pb^{2+} hingga konsentrasi 10 ppb. Hal sekali lagi menunjukkan kemampuan XO untuk meningkatkan akumulasi ion Pb^{2+} pada permukaan elektroda. Kelinieran kurva kalibrasi yang diperoleh cukup baik untuk analisis.

Akurasi pengukuran: Untuk menguji akurasi pengukuran timbal dengan kedua elektroda ini, dilakukan penentuan persen perolehan kembali dari analisis *spike sample* di dalam matriks air laut, air sungai dan air mineral. Hasil analisis Pb^{2+} di dalam ketiga matriks air ini ditunjukkan pada Tabel 1-3 berikut.

Nilai persen perolehan kembali analisis timbal di dalam ketiga matriks air yang dipelajari mendekati 100%. Ini menunjukkan akurasi analisis yang sangat baik. Akurasi pengukuran

dengan elektroda SXO sangat baik pada daerah konsentrasi 0,01 – 10 ppm namun berkurang pada konsentrasi lebih kecil dari 0,01 ppm. Di lain pihak akurasi pengukuran dengan elektroda SG cukup baik pada daerah konsentrasi 0,1 – 10 ppm dan berkurang pada konsentrasi dibawah 0,1 ppm. Data ini sekali lagi menunjukkan kemampuan XO dalam meningkatkan akumulasi ion Pb^{2+} di permukaan elektroda.

4. Daftar Pustaka

Brainina Kh. Z., Stozhko N. Yu., Belysheva G. M., Inzhevatova O. V., Kolyadina L. I., Cremisini C., Galletti M., (2004). Determination of heavy metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick-film modified electrode, *Anal. Chim. Acta*, 514(2) 227-234.

Demetriades D., Economou A., Voulgaropoulos A., (2004) A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 519(2), 167-172.

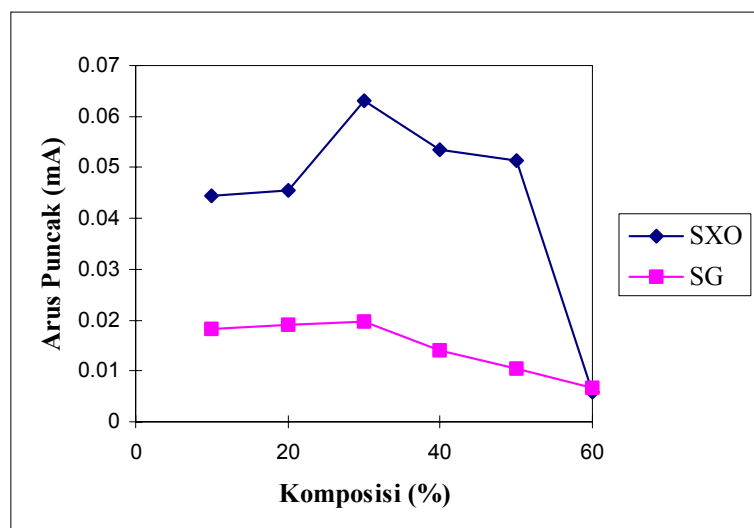
Ouangpipat W., Lelasattathkul T., Dongduen C. and Liawruangrath S., (2004). Bioaccumulation and determination of lead using treated-*Pennisetum*-modified carbon paste electrode, *Talanta*, 61(4), 455-464.

Yantasee W., Lin Y., Fryxell G. E., Busche B. J., (2004). Simultaneous detection of cadmium, copper, and lead using a carbon paste electrode modified with carbamoylphosphonic acid self-assembled monolayer on mesoporous silica (SAMMS), *Anal. Chim. Acta*, 502(2), 207-212.

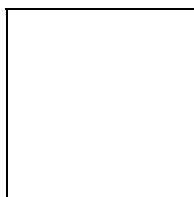
Yuan S., Chen W., Hu S., (2004). Simultaneous determination of cadmium (II) and lead (II) with clay nanoparticles and anthraquinone complexly modified glassy carbon electrode, *Talanta*, 64(4), 922-928.

Zaporozhets, O. A., Tsyukalo, L. Ye., (2002) Xylenol Orange Adsorbed on Silica Surface As a Solid Phase Reagent For Lead Determination Using Diffuse Reflectance Spectroscopy, *Talanta*, 58, 861-868.

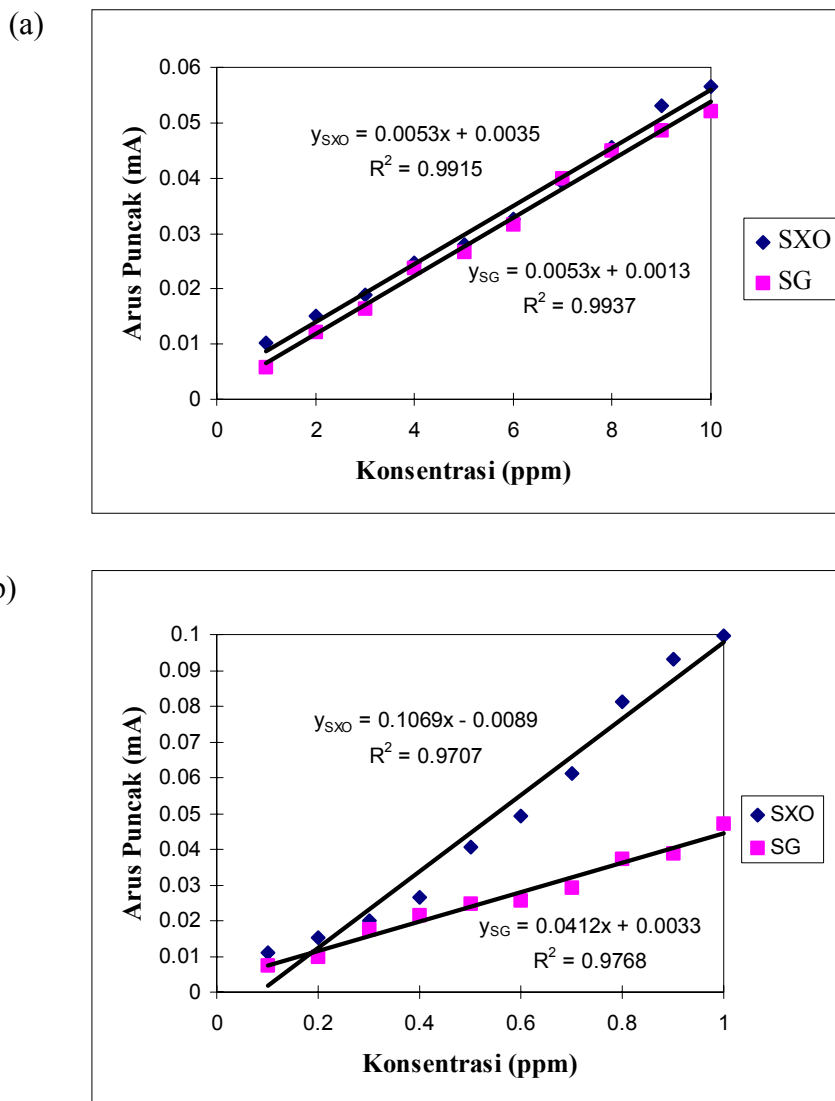
LAMPIRAN



Gambar 1. Pengaruh komposisi SXO dan SG terhadap arus puncak



Gambar 2. Kebolehhulangan pengukuran elektroda SXO dan SG



Gambar 3. Kurva kalibrasi Pb²⁺ (a) 1-10 ppm dan (b) 0,1-1 ppm

Tabel 1. Persen perolehan kembali Pb²⁺ dalam air laut

Daerah Konsentrasi (ppm)	Elektroda SXO			Elektroda SG		
	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)
	Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)		Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)	
1-10	5,66	5,58	98,59	5,66	5,76	101,76
0,1-1	0,57	0,55	97,07	0,71	0,71	100,51
0,01-0,1	0,061	0,060	98,78	0,074	0,071	95,52
0,001-0,01	0,007	0,006	94,80	-	-	-

Tabel 2. Persen perolehan kembali Pb^{2+} dalam air sungai

Daerah Konsentrasi (ppm)	Elektroda SXO			Elektroda SG		
	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)
	Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)		Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)	
1-10	5,66	5,76	101,84	5,66	5,61	99,17
0,1-1	0,57	0,58	102,83	0,54	0,53	98,22
0,01-0,1	0,061	0,063	102,63	0,074	0,078	105,07
0,001-0,01	0,007	0,006	93,85	-	-	-

Tabel 3. Persen perolehan kembali Pb^{2+} dalam air mineral

Daerah Konsentrasi (ppm)	Elektroda SXO			Elektroda SG		
	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)	Konsentrasi		Persen Perolehan Kembali (%)
	Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)		Sebenarnya (ppm)	Hasil Per- hitungan (ppm)	
1-10	5,66	5,52	97,59	5,66	5,47	96,63
0,1-1	0,38	0,37	98,69	0,54	0,55	101,92
0,01-0,1	0,070	0,068	97,20	0,074	0,071	95,80
0,001-0,01	0,007	0,006	94,80	-	-	-

Isolation And Identification Of α -Glucosidase Inhibitor Active Constituents From The Twigs of *Taxus sumatrana*.

L.B.S. Kardono¹⁾, N. Artanti¹⁾, Lince Yarni²⁾, Chairul³⁾, and S. Wiryowidagdo⁴⁾

¹⁾ Research Center for Chemistry, Indonesian Institute of Sciences,
Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Indonesia

l_kardono@yahoo.com

²⁾ National Drug and Food Control Agency,
Jl. Percetakan Negara 23, Jakarta, Indonesia.

³⁾ Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences,
Jl. Ir. H. Djuanda 22, Bogor, Indonesia

⁴⁾ Department of Pharmacy, University of Indonesia,
Depok, Indonesia

Abstract

In the program for the search of bioactive compounds from Indonesian rain forest plants water- and organic-soluble extracts of the twigs of *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels have been evaluated for their α -glucosidase inhibitory activity. The ethanol- and ethyl acetate-soluble extracts showed significant activity ($IC_{50} \pm 15 \mu\text{g/ml}$). From phytochemical preliminary evaluation, it was suggested that the active compounds were probably either flavonoids or taxane diterpenoids. Further isolation work using high performance liquid chromatography, a known anticancer paclitaxel has been isolated, as one of the active compounds.

Key words: *taxus*, α -glucosidase, taxol, paclitaxel.

1. Introduction

Taxus is a wide spread conifer genus. It occurs in Eurasia as well as in North America, where it is represented by 4 species, one of which reaches south as far as Honduras. All species are slow growing, small to medium sized trees adapted to an existence in understory of coniferous, angiosperm or mixed forest. Their monospermous female organs develop various arillous structures attracting birds aiding in dispersal. In northern latitudes taxoid conifers occur in the low lands as well as in the mountains, in the subtropics and tropics they are exclusively montane (Crag *et al.*, 1993).

Taxus sumatrana is the only *Taxus* species grown in Indonesia. This plant is reported grown in Mount Kerinci, Sumatera, and Mountainous area in Sulawesi, however, its existence in Sulawesi is not confirmed yet (Gymnosperm Database). As *Taxus* species, this plant is producing taxane terpenoids, including paclitaxel or taxol, the anticancer compound. Taxol is first isolated from

Canadian and North American Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. Similar species grown in Europe *Taxus baccata* is a natural resources for semi synthetic of taxol, taxotere. Another taxol sources are Asian species, *Taxus cuspidata*, *T. chinensis*, *T. yunnanensis*, *T. wallichiana*, *T. media* and *T. wallichiana*. Many compounds have been isolated from *Taxus* species. A series of taxoids, taxupines, taxopidines possess skeletons containing various member of rings. Among the isolated, some non-taxol-type compounds exhibited taxol-like-activity to inhibit markedly CaCl_2 -induced depolymerization of microtubules and some induce over-stabilized spindles with strong birefringence like taxol (Wani, *et al.*, 1971; Kingston, 1994; Crag *et al.*, 1993; Georg *et al.*, 1994). Taxol content of *T. sumatrana* dried leaves has been studied previously, and the yield of taxol was *ca* 0.006% (Kitagawa, *et al.*, 1995). LC-MS analysis of *T. sumatrana* methanol extract detected the mass spectra of taxol, cepahomannine, 7-epi-10-deacetyl taxol,

7-epi-10-deacetylcephalomannine, baccatin III, 19-hydroxybaccatin III, 10-deacetyl-13-oxobaccatin III, 19-hydroxy-13-oxobaccatin III, 20-deacetylaxathriene A, and 5-deacetylaxathriene B (Lotulung *et al.*, 2002). Currently *T. sumatrana* has been cultivated in Arjuna Arboretum, Malang, East Java for conservation purposes as well as further potential utilization of this rare plant (Trisnamurti *et al.*, 2003).

Evaluation activity related for treatment and prevention of diabetes and obesity were inhibition of enzymes such as α -amylase and α -glucosidase, which improving blood sugar tolerance from hypertension, and normalized blood sugar (Shimoda, *et al.*, 1998; Fotinos, 1999; Gray and Flatt, 1999; Gray *et al.*, 2000; Broadhurst *et al.*, 2000; Kawabata and Kasai, 2000; Kusunoki, 2001; Yamahara, *et al.*, 2001). The α -glucosidase and α -amylase inhibitors inhibit digestion of starch to suppress obesity, diabetes (Murata *et al.*, 2000). Evaluation of α -glucosidase inhibition activity is one of analysis that can be used for in vitro screening of plants that has potential to use for treatment and prevention of diabetes and obesity. Principle of this method is shown in Figure 1. Addition of sample that has inhibitory activity will decrease the p-nitrophenol produce, hence lower the absorbance reading compare to blank. This method has been used in our lab to screen 60 plants from mount Rinjani forest for their antidiabetic potential (Kardono *et al.*, 2002). Previous studies in our lab show that ethanol extract of *T. sumatrana* showed some bioactivities (Artanti *et al.*, 2002; 2003) including inhibition of α -glucosidase. So far that we are aware, there is no report yet on inhibition of α -glucosidase from any *Taxus* species (USDA Database) and only one report showed low inhibition of *T. cuspidata* extract on α -amylase activity (Kim *et al.*, 2004). In present paper, we reported isolation and identification of an α -glucosidase inhibitor compound from the twigs of *T. sumatrana*.

2. Experimental

General Experiment Procedures. Melting points were measured on Electro thermal: Digital Melting Point Apparatus and uncorrected. Infra red spectra were recorded in KBr using Perkin-Elmer infrared spectrophotometer. EI and CIMS (direct) and HREIMS spectra were determined on JMS AX

500 mass spectrometer at 70 eV. ^1H and ^{13}C -NMR spectra were recorded at 500 MHz and 125 MHz on a Varian 500 instruments using CDCl_3 . Standard Varian pulse sequence were are used for HMQC and HMBC experiment. Chromatographic separations were carried out on silica gel 60 (70-230 mesh, ASTM) and various solvents. TLC chromatographic analysis was accomplished on a pre-coated silica gel 60 GF₂₅₄ plates (E. Merck).

Plant Material. The twigs of *T. sumatrana* was collected from Mount Kerinci in 2003. A voucher specimen of *T. sumatrana* was identified and deposited in Herbarium Bogoriense, Indonesian Institute of Sciences, Bogor, West Java, Indonesia.

α -Glucosidase Inhibition. Evaluation of α -glucosidase inhibition was done according to Prashanth *et al.* (2001) using p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside as substrate and α -glucosidase enzyme from *Saccharomyces* sp. Quercetin was used as positive control of α -glucosidase inhibitor compound. The IC_{50} value was defined as the concentration of sample to inhibit 50% of α -glucosidase activity under the assay conditions.

Extraction and Isolation. The dried twigs of *T. sumatrana* (3.5 kg) were macerated 24 hours in 95% ethanol for three times, resulted to 106 g of the ethanol extract. The extract (86 g) then dissolved in methanol water(1:1) and was subjected to liquid-liquid separation with n-hexane followed by ethyl acetate. Ethyl acetate fraction (23 mg) was subjected to 500 g silica gel kieselgel 60 (70-230 mesh, ASTM) column chromatography with a mixture of hexane-ethyl acetate of increasing polarity (0 - 100 % ethyl acetate) as the solvent system. The fractions with TLC similar patterns were collected and evaporated to 19 fractions (Fraction A to S). Fraction H (250 mg) was subjected to separation and isolation using HPLC (Shimadzu; Shimadzu RID 6 A detector; CR 7 A chromatopac recorder; Shim Pack CLC Sil (4.6 mm x 15 cm) column; eluent: n-Hexane:ethylacetate (6:4); flow rate: 1 ml/minute, injection volume: 20 μl .) the isolated compound were subjected to TLC, UV-Vis spectrophotometry Hitachi and Shimadzu), FTIR (Bio Rad Merlin), and ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz)-NMR (Varian).

3. Results and Discussion

Our preliminary phytochemical evaluation showed that the twigs contains terpenoids, flavonoids, alkaloids, tannins and saponins (Farnsworth, 1966)

The yield of *T. sumatrana* twigs crude ethanol extract is 106 g (3.03%). Liquid-liquid separation of 86 g crude ethanol extract resulted 36.42 g (1.15%) n-hexane fraction, 31.34 g (0.9%) ethylacetate fraction and 29.10 g water fraction (0.83%). Evaluation of α -glucosidase inhibition activity of these extract and fractions is shown in Table 1.

Table 1 show that ethylacetate fraction has the highest α -glucosidase inhibition activity. Activity of this fraction is higher than quercetin which a known α -glucosidase inhibitor that was used as positive control. Hence the ethylacetate fraction (23 g) was subjected to column chromatography based on step gradient polarity to isolate the α -glucosidase inhibitor compound. After combining fractions which gave similar TLC profiles, the column chromatography gave 19 fractions (Fraction A to Fraction S).

UV spectrophotometry analysis showed that Fraction H has spectrum characteristic similar to taxoid derivative. Further separation of Fraction H was conducted using HPLC to isolate pure compounds. Figure 2 show 8 compounds isolated from Fraction H.

Compound 8 (amorph white powder) the most polar compound in Fraction H was chosen for further identification because it has good α -glucosidase inhibition activity with IC_{50} 14.18 μ g/ml. This compound has UV spectrum (Figure 3) with λ_{max} at 285.50 which a characteristic of conjugated bond of C=N dan C=O. This result supported by IR spectrum (Figure 4) that showed the present of C=O functional group (Figure 4).

Based on 1H and ^{13}C NMR analysis (Figure 5 and 6) it was found that compound 8 has 51 proton, 47 carbon, 14 oxygen and 1 nitrogen, molecular formula is $C_{47}H_{51}NO_{14}$ with calculated molecular weight is 853.99. This molecular formula and MW is the same with molecular formula and MW of paclitaxel (taxol). Comparing the 1H and ^{13}C NMR data of compound 8 with previously published taxol NMR data (Kitagawa *et al*, 1995) (Table 2 and

3) confirmed that compound 8 is taxol (Figure 7)

4. Conclusion

Based on NMR analysis and supported by UV and IR analysis results, it is concluded that compound 8 which an α -glucosidase inhibitor with (IC_{50} 14.18 μ g/ml) is taxol. So far that we are aware, this is the first report on α -glucosidase inhibition activity of taxol. This result could open the new potential used of taxol in treatment or prevention of diabetes or obesity to be studied further. Bioactivity and structure elucidation of other compounds from *T. sumatrana* are still under investigation.

5. Acknowledgement

1H and ^{13}C NMR measurement was conducted in Osaka City University, JAPAN.

6. References

- Artanti, N., Hanafi, M., Liswidowati, Kardono, L.B.S., Minarti and Darmawan, A. (2003) Evaluation of anticancer, antioxidant, antidiabetes and toxicity of *Taxus sumatrana* ethanol extract. Proceeding of Seminar on Traditional Medicine, Diponegoro University, Semarang, Indonesia, Juli 2003. (In Indonesian)
- Artanti, N., L. B. S. Kardono, and M. Hanafi. (2002) Inhibitory activity of Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) extract and *Taxus sumatrana* (Miquel) de Laubenfels extract to α -Glucosidase enzyme. Proceeding of National Seminar on Chemistry in Indonesian Development V,- JASA KIAI Yogyakarta, 26-27 Maret 2002.(In Indonesian)
- Broadhurst, C. Leigh; Polansky, Marilyn M.; Anderson, Richard A. Insulin-like Biological Activity of Culinary and Medicinal Plant Aqueous Extracts *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48(3), 849-852.
- Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M. & Grever, M.R. 1993. The Taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *Journal Natural Product* 56:1657-1668.
- Farnsworth, N.R. (1996) Biological and Phytochemical Evaluations of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 5, 225-265
- Fotinos, S. A prolamine-plant polar lipid composition, its method of preparation and applications thereof. PCT Int. Appl. (1999), 37 pp., WO 9917738 A1 19990415.
- Georg, G.L., Chen, T.T., Ojima, I. & Vyas, D.M. (eds.). 1994. *Taxane Anticancer Agents (Basic Science Current Status*, American Chemical

- Society. Symposium Series no. 583). Washington, D.C., American Chemical Society.
- Gray, A. M. and Flatt, P. R. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *J. Endocrinol.* (1999), 160(3), 409-414.
- Gray, A.M.; Abdel-Wahab, Y.H. A. and Flatt, P. R. The traditional plant treatment, *sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro. *J. Nutr.* (2000), 130(1), 15-20.
- Gymnosperm Database
<http://www.conifers.org/ta/ta/sumatrana.htm>
- Kardono L.B.S.; Dewi, R.T.; Lotulung, P.D. and Riswan, S: (2002). Screening On α -Glucosidase Inhibitory Activity Of Wood Extractives Of Plant Collected From Mount Rinjani Forest. International Wood Science Seminar, JSPS-LIPI, Serpong, September 2002
- Kawabata, J. and Kasai, T. Compositae plants or their extracts as α -glucosidase inhibitors for treatment of obesity and diabetes. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2000), 3 pp. JP 2000229875 A2 20000822, JP 99-30719 19990209.
- Kim, Y., Wang, M., Rhee, H. (2004) A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark, *Carbohydrate Research* **339**, 715–717
- Kingston, D.G.I. 1994. Taxol: the chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *TibTech* 12:222-227.
- Kitagawa, I.T., Mahmud, M. Kobayashi, Roemantyo, and H. Shibuya. Taxol and its related taxoids from the needles of *Taxus sumatrana*. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, **43**, 365-367.
- Kusunoki, Jun. α -Amylase inhibitor of medicinal plant. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2001), 4 pp. JP 2001240552 A2 20010904, JP 2000-200056717 20000302.
- Lotulung, P.D., Sundowo, A., Kardono, L.B.S. Darnaedi, D., Tachibana, S. (2002). LC-MS Evaluation of taxol content from *Taxus sumatrana* extractives. International Wood Science Seminar, JSPS-LIPI, Serpong, September 2002
- Murata, Tatsuo; Furubayashi, Miho; Tsukiyama, Yoshikazu. Plant-derived α -amylase inhibitors with high affinity to starch, starch products containing them, and their uses. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2000), 9 pp. JP 2000044484 A2 20000215, JP 98-230299 19980731
- Trisnamurti, R.H., Lotulung, P.D., Agustina, H., Kardono, L.B.S., Sumarnie, Bahagio, S., Harnanto, A. (2003). Study On Plant Producing Anticancer Taxol *Taxus Sumatrana* For Conservation And Sustainable Development. Third Conference of Science Council of Asia, Denpasar-Bali, 13-15 May 2003
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. & McPhail, A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal American Chemical Society* 93:2325-2327.
- Yamahara, J. *Salacia* and other plants containing thiosugars for improving blood sugar tolerance from hypertension. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2001), 6 pp. JP 2001226275 A2 20010821, JP 2000-200033438 20000210.

Appendix

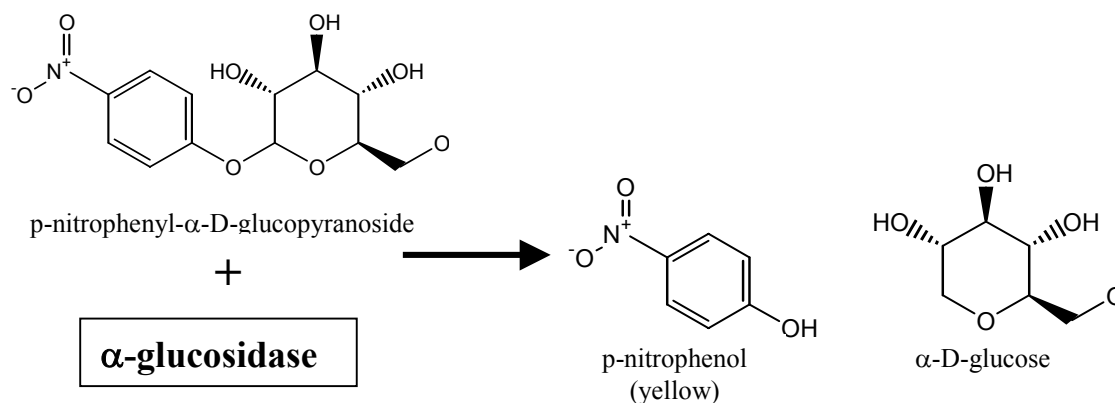


Figure 1. Assay of α -glucosidase

Table 1. α -glucosidase inhibition activity of *T. sumatrana* twigs ethanol extracts and its fractions

No	Samples	IC ₅₀ (μ g/ml)
1	Ethanol extract	20.28
2	n-hexane fraction	29.84
3	Ethylacetate fraction	14.72
4	Water fraction	19.37
5	Quercetin*	15.11

*) positive control

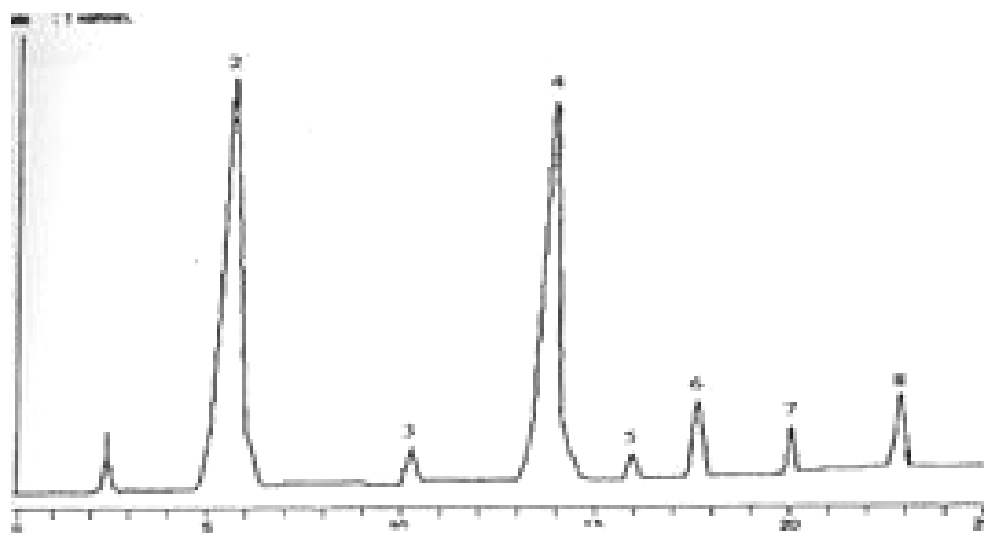


Figure 2. HPLC analysis of Fraction H

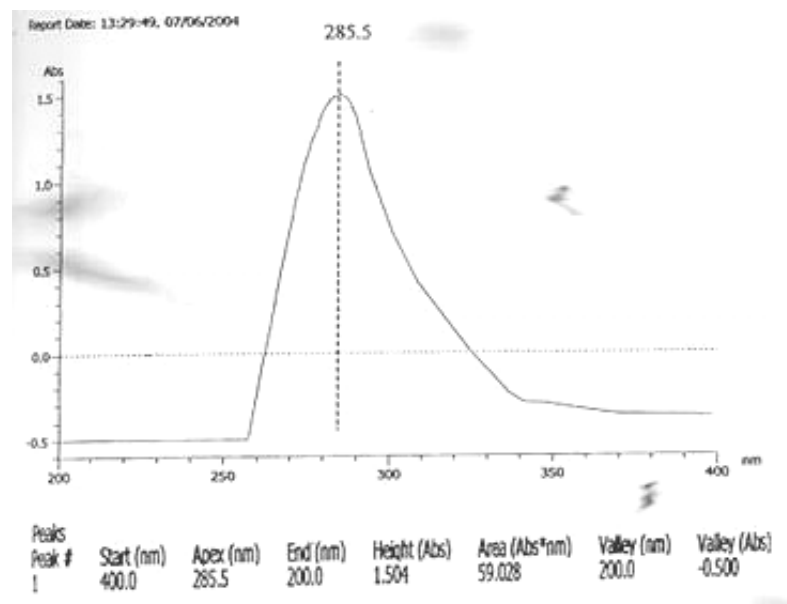


Figure 3. UV-Vis spectrum of compound **8**.

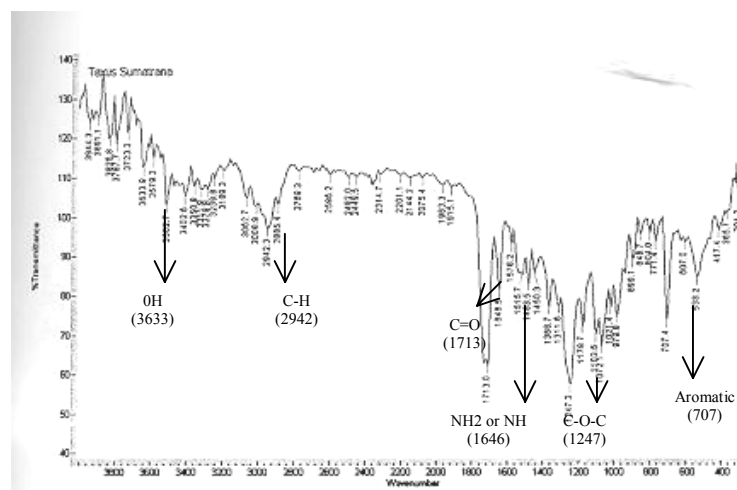


Figure 4. IR spectrum of compound **8**.

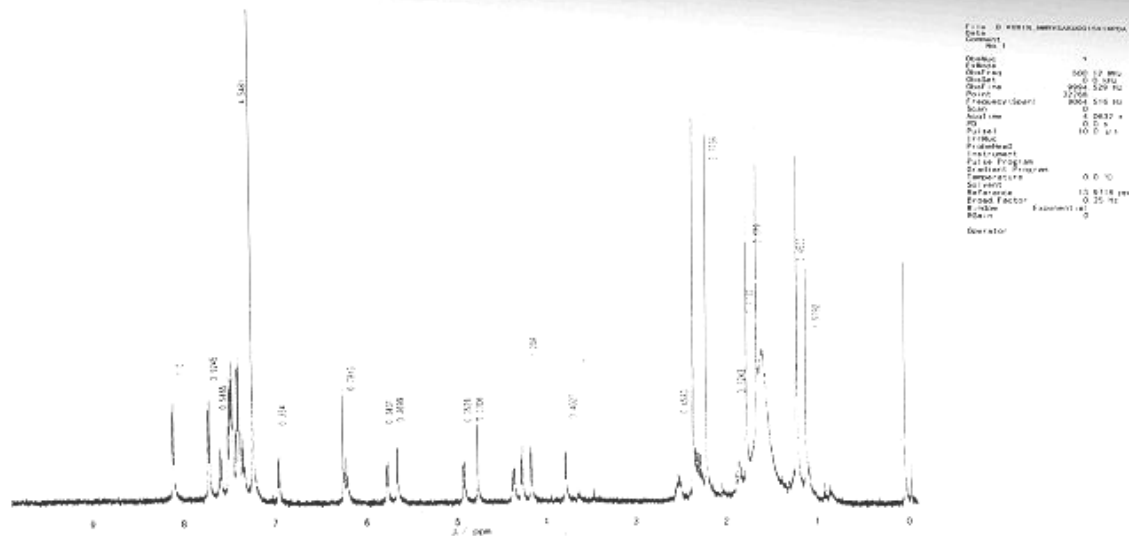


Figure 5. ^1H NMR spectra of Compound **8** (500 MHz, CDCl_3)

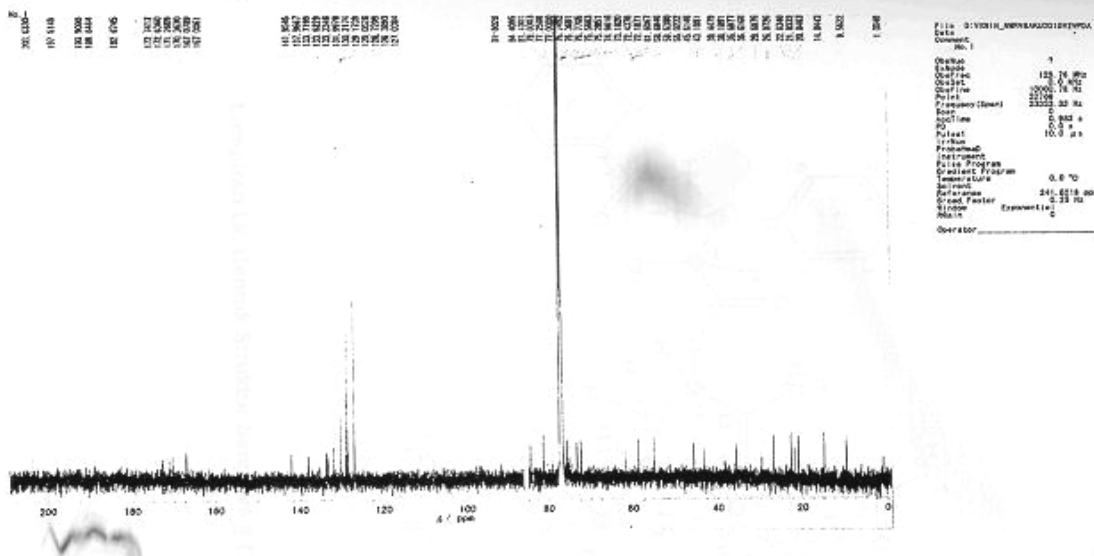


Figure 6. ^{13}C NMR spectra of Compound **8** (125 MHz, CDCl_3)

Table 2. Comparison of ^1H NMR data of Taxol and Compound **8**

No	^1H NMR of taxol in CDCl_3 (Kitagawa <i>et al.</i> , 1995)	^1H NMR of Compound 8 in CDCl_3
1	1,76 (1 H, s, 1-OH)	1,78 (1 H, s, 1-OH)
2	5,67 (1H, d, J = 7 Hz 2-H)	5,65 (1H, d, J = 7 Hz 2-H)
3	3,80 (1H, d, J = 7 Hz, 3-H)	3,77 (1H, d, J = 7 Hz, 3-H)
4	-	-
5	4,94 (1 H, d, J = 9 Hz 5-H)	4,92 (1 H, d, J = 9 Hz 5-H)
6	1,88 (1 H, m, 6 β -H) 2,55 (1 H, m, 6 α -H)	1,86 (1 H, m, 6 β -H) 2,54 (1 H, m, 6 α -H)
7	4,40 (1 H, m, 7-H) 2,45 (1 H, d, J = 4.5 Hz 7-OH)	4,39 (1 H, m, 7-H) 2,50 (1H,dd, J = 5 Hz 7-OH)
8	-	-
9	-	-
10	6,27 (1 H, s, 10-H)	6,25 (1 H, s, 10-H)
11	-	-
12	-	-
13	6,95 (1 H, d, J = 8.5 Hz, 13 H)	6,95 (1 H, d, J = 8,5 Hz, 13 H)
14	2,29 (1 H, m, 14 β -H) 2,35 (1 H, m, 14 α -H)	2,28 (1 H, m, 14 β -H) 2,34 (1 H, m, 14 α -H)
15	-	-
16	1,14 (3 H, s, 16 metil)	1,13 (3 H, s 16 metil)
17	1,24 (3 H, s, 17 metil)	1,22 (3 H, s 17 metil)
18	1,79 (3 H, s, 18 metil)	1,79 (3 H, s, 18 metil)
19	1,68 (3 H, s, 19 metil)	1,67 (3 H, s, 19 metil)
20	4,20 (1 H, m, J = 8 Hz, 20 β -H) 4,30 (1 H, m, J = 8 Hz, 20 α -H)	4,17 (1 H, m, J = 8 Hz, 20 β -H) 4,28 (1 H, m, J = 8 Hz, 20 α -H)
1'	-	-
2'	2,38 (3 H,s, 4-OAct)	2,37 (3 H,s, 4-OAct)
3'	-	-
4'	-	-
5'	2,24 (3 H, s, 10-OAct)	2,22 (3 H, s, 10-OAct)
6'	-	-
7'	4,79 (1H, s, 2-H) 3,53 (1H, s, J = 5 Hz, 2-OH)	4,77 (1H, s, 2-H) 3,46 (1H, s, J = 5 Hz, 2-OH)
8'	5,79 (1 H, dd, J = 8.5, 2.6 Hz 3-H) 6,97 (1 H, d, J = 8.5 Hz, 3-NH)	5,78 (1 H, dd, J = 9, 2.6 Hz 3-H) 6,95 (1 H, d, J = 9 Hz, 3-NH)
9'	-	-
K ₁	-	-
K ₂	7,67 (2 H, d, J = 7 Hz, H)	7,67 (2 H, d, J = 7 Hz, H)
K ₃	7,33 (2 H, dd, J = 7 Hz, H)	7,33 (2 H, dd, J = 7 Hz, H)
K ₄	7,42 (1 H, dd, J = 7 Hz, H)	7,42 (1 H, dd, J = 7 Hz, H)
K ₅	-	-
K ₆	-	-
L ₁	-	-
L ₂	7,41 (2 H, d, J = 7 Hz, H)	7,41 (2 H, d, J = 7 Hz, H)
L ₃	7,35 (2H, d, J = 10 Hz, H)	7,37 (2 H, d, J = 10 Hz, H)
L ₄	7,28 (1 H, dd, J = 9 Hz, H)	7,28 (1 H, dd, J = 9 Hz, H)
L ₅	-	-
L ₆	-	-
M ₁	-	-
M ₂	8,06 (2 H, d, J = 8 Hz, H)	8,06 (2 H, d, J = 8 Hz, H)
M ₃	7,44 (2 H, d, J = 7 Hz, H)	7,44 (2 H, d, J = 7 Hz, H)
M ₄	7,54 (1 H, dd, J = 8 Hz, H)	7,54 (1 H, dd, J = 8 Hz, H)
M ₅	-	-
M ₆	-	-

$$\sum \text{H} = 51$$

Table 3. Comparison of ^{13}C -NMR data of Taxol and Compound **8**

No	^{13}C NMR of taxol in CDCl_3 (Kitagawa <i>et al.</i> , 1995)	^{13}C NMR of Compound 8 in CDCl_3
1	79,05	79,03
2	74,98	74,96
3	45,64	45,61
4	81,19	81,19
5	84,41	84,41
6	35,62	35,62
7	72,18	72,19
8	58,65	58,64
9	203,61	203,63
10	75,57	75,57
11	133,23	133,23
12	141,95	141,95
13	72,41	72,44
14	35,72	35,70
15	43,19	43,19
16	26,88	26,87
17	21,83	21,83
18	14,83	14,84
19	9,57	9,56
20	76,52	76,40
1'	170,35	170,36
2'	22,63	22,63
3'	167,04	167,08
4'	171,22	171,26
5'	20,84	20,84
6'	172,72	172,74
7'	73,20	73,18
8'	55,04	55,02
9'	167,01	167,01
K ₁	133,23	133,62
K ₂	130,21	130,22
K ₃	129,03	129,05
K ₄	131,97	132,0
K ₅	128,72	128,72
K ₆	127,04	127,04
L ₁	137,99	137,97
L ₂	128,70	128,39
L ₃	127,04	127,04
L ₄	128,37	128,39
L ₅	129,03	129,05
L ₆	127,04	127,04
M ₁	129,18	129,17
M ₂	128,72	128,72
M ₃	127,04	127,04
M ₄	133,71	133,72
M ₅	128,70	128,39
M ₆	130,21	130,22

$\Sigma \text{C} = 47$

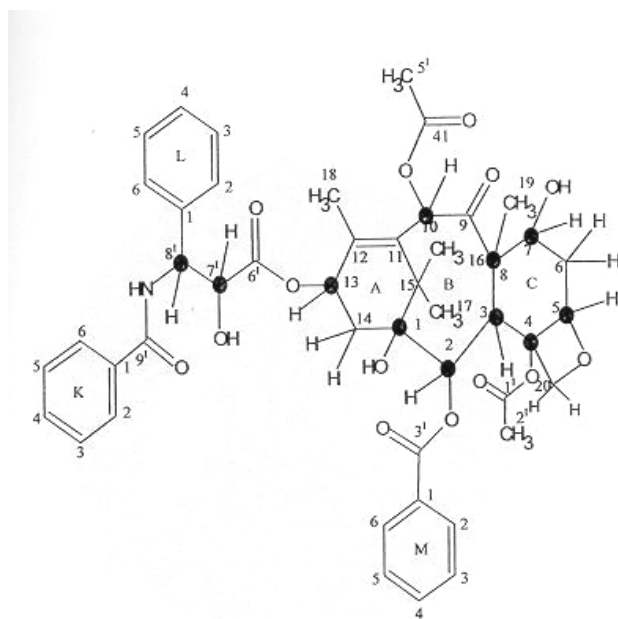


Figure 7. Taxol (Paclitaxel)

Nutritional Composition And Sensory Evaluation Of Chicken Essence

Abdul Salam Babji, Farah Nurshahida and Ch'ng Soo Ee

Food Science Programme, School of Chemical Sciences and Food Technology
Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia
43600, Bangi, Selangor, Malaysia.
E.mail: daging@pkriscc.chem.ukm.my

Abstract

Chicken essence, raw meat and cooked meat from spent hen and broiler chicken were analysed for nutrients composition (AOAC method). Sensory evaluation of chicken essence from spent hen, broiler and a marketed product (Brand's) and amino acid profile analysis (HPLC method) were also carried out. From the study, spent hen's essence contained 1.34% protein and 1.5% fat while broiler's essence had 6.2% protein and 2.62% fat. There were differences in fat, protein, water and total ash composition in raw and cooked meat of both type of chicken. Raw spent hen's meat contained 18.6% protein, 0.99% fat, 73% water and 1.1% total ash while raw broiler's meat contained 17.01% protein, 1.86% fat, 78.18% water and 0.84% total ash. Cooked spent hen's meat contained 30.7% protein, 1.39% fat, 60.6% water and 0.81% total ash and cooked broiler's meat showed 21.79% protein, 1.45% fat, 71.45% water and 0.51% total ash in the composition. The color of broiler's essence is the lightest and the deepest red while for yellowness, spent hen's essence had the highest intensity. From sensory evaluation, spent hen's essence had the characteristics of chicken essence that was most favored by the consumers. Spent hen's essence showed the highest value in all evaluated attributes. Fifteen amino acids were detected in chicken essence. The major amino acid component in spent hen's essence is histidine (248 mg/100g), while for broiler essence, it was glycine at 474 mg/ 100 g. Lysine was the lowest acid amino component in both essences of chicken.

Keywords: *nutritional composition, sensory evaluation, chicken essence*

1. Introduction

Large quantity of spent hen is a by-product of egg industry and they have low market value and is often under utilized. Spent hen meat is often used as raw material in value-added products such as bologna, sausages, neat balls and burgers. Chicken essence is a popular functional food. It is prepared traditionally by using double-boiled method and is strongly believed to have good nutritional values especially among Chinese community. It is an extraction of juice from the muscles of chicken and its the popularity is increasing as the nutritional advantages is proven worldwide. (Nagai et al. 1996). Chicken essences were proven effective in healing anxiety and improve memory among students (Utusan Malaysia 2001). Free amino acids and dipeptides

are important attributes towards the sensory and nutritional values in chicken essence. The specific components such as taurine, anserine, carnosine and other peptides are the main components in chicken essence. Taurine was found in large quantity and was shown aiding in gall bladder juice synthesis and avoiding pathology problems (Sturman 1993). Carnosine and Anserine are the main dipeptides in skeleton muscles for most of the vertebrate. It helps in physiology function in the human body (Crush 1970).

The main objectives of this research are to compare the nutritional and sensory values of chicken essence from broiler and spent hen with a marketed products as control. The preliminary tests on broiler meat and spent hen

were carried out to achieve the end product that is more acceptable to consumers.

2. Experimental

Preparation of Chicken Essence

Defatted and deskinmed chicken meat (500g) was steamed with 600ml water. It was steamed at 160°C for 1 hour. No additive was added. The essence of chicken was diluted with 100ml water, then filtered with Whatman filter paper (No. 1) using vacuum filtration system. The amount of chicken essence collected were 50-60ml. It was sterilized in an autoclave at 121°C for 15 min. The container was also sterilized to prevent contamination and microbial growth.

Proximate Analyses

Protein content was determined using Macrokjedahl method while fat content was determined using Monjonier method (A.O.A.C 1984). Moisture and ash content were determined by using oven methods (A.O.A.C 1984).

Color Measurement

The color of chicken essence were determined for L (lightness), a (redness) and b (yellowness) using a Minolta Chromameter CR-100.

pH Determination

pH of chicken essence were determined by using a pH meter Model 8314 that was calibrated at pH 7.0.

Sensory Evaluation

Sensory evaluation was carried out using the Hedonic Scale of 1=lowest and 5= highest for scoring various attributes. A panel of 30 people was used to evaluate the color, viscosity, sweetness, aroma, chicken flavor and overall acceptance of these samples.

Amino Acid Analyses

Amino acid profile were determined by using HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Statistical Analyses

The data were analyzed using the Statistical Analyses System (SAS) program version 6.12 (SAS 1995). Treatments showing significant differences ($p < 0.05$) were subjected to the Duncan's Multiple Range Test.

3. Results and Discussion

Table 1 showed the protein and fat contents of broiler's and spent hen essences. The protein and fat content of broiler's essence was

significantly higher compared to spent hen's essence. The low protein content of spent hen essence is due to less dissolved protein during the extraction of juice compared to broiler that is high in dissolved protein. However, protein content in spent hen meat (raw or cooked) was higher than broiler meat (Table 2).

From Table 1, fat content in broiler's essence was also significantly higher compared to spent hen essence while Table 2 showed that broiler meat (cooked and raw) were higher compared to spent hen meat. Higher fat content in broiler's essence is due to the low consumption of energy compared to layers (Hague et al. 1994). Spent hen were older and the fat within muscles was less due to the energy consumption during laying eggs. However, the visible fat was more compared to broiler. Body fat content was determined by the feed and activity of the chicken (Hirata et al. 1988).

Moisture content in broiler is significantly higher compared to spent hen meat. Wu & Shiau (2002) showed lower moisture content in spent hen. Lower moisture content resulted in less juiciness in the texture and explained the less popularity of spent hen (Kondaiah 1988). On the other hand, ash content is significantly higher in both raw and cooked spent hen (Fig 2). High content of ash in spent hen meat probably contributed by the waste from feed such as antibiotic and mineral (Ismail et al 2000).

Table 3 showed that broiler essence is the lightest and most reddish among all three treatments while spent hen essence is the most yellowish sample. Spent hen essence is darker due to the myoglobin pigment in the muscles and meat. The darkness of the meat increased with age as the myoglobin increased (Lawrie 1991). Redness of the treatments maybe contributed by Millard Reaction during cooking or from animal feed that contained carotenoid (Hoffman & Fisher 2000). Anthocyanin in chicken feed made from corn can be a major factor to the yellowness of the treatments (Hoffman & Fisher 2000).

Table 4 showed that there was significant difference among the three treatments. All the treatments showed that chicken essence were not acidic and more toward neutral (Hague et al. 1994).

Figure 1 showed the data collected from sensory scores of color, viscosity, aroma, chicken flavor, sweetness, overall acceptance among 30 panels. Spent hen essence had the highest score for every attribute and was the most likable product for the panelists although there was no significant difference among the three treatments for color and viscosity. The chicken flavor, sweetness aroma of spent hen chicken essence was significantly highest among the treatments. The marketed products (Brand's) had the lowest score and were significantly different in aroma, chicken flavor, sweetness and overall acceptance. The panels still prefer the spent hen essence among the three treatments.

Five samples were injected into the analytical instrument (HPLC) where two of them were samples of broiler's essence and spent hen essence. The rest were blank and standard. Every sample required about 50 minutes to determine the presence of amino acid in broiler's essence and spent hen's essence.

The composition of amino acid in spent hen's essence and broiler's essence was shown in Fig. 2. Both samples contained 15 amino acids:- aspartic acid, theonine, serine, glutamic acid, glycine, alanine, valine, metionine, isoleusine, tyrosine, phenylalaine, lysine, histidine, and proline. The highest composition of amino acid in spent hen's essence are histidine (248mg/ 100g) followed by glutamate acid (215mg/100g) and glyisine (138mg/ 100g). The lowest composition was lysine 918mg/ 100g).

On the other hand, the highest composition of amino acid in broiler's essence is glycine (474mg/ 100g), glutamate acid (203mg/ 100g), proline (166mg/ 100g), histidine 9153mg/ 100g) while the lowest was lysine (7mg/ 100g).

The higher quantity of amino acid in broiler's essence was probably contributed by the higher protein content compared to spent hen's essence. Lysine was found least in both samples as lysine can be destroyed during heating in Millard reaction (Amubode & Fetuga 1984).

4. Conclusion

Spent hen essence was popular among the consumers compared to the broiler's essence and marketed product. Utilization of spent hen (a by-product from the egg industry) is

encouraged to lower the production costs without compromising on nutritional and sensory values, as reflected in the production of spent hen chicken.

5. References

- Amudobe, F. O. & Fetuga, B. L. 1984. Amino acid composition of seeds of some lesser known tree crops. *Food Chem.* **13**: 299-307.
- Crush, K. G. 1970. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **34**: 3-30.
- Hague, M. A., Warren, K. E., Hunt, M. C. , Kropf, D. H., Kastner, C. L., Stroda, S. L. & Johnson, D. E. 1994. Endpoint temperature, internal cooked color and expressible juice color lationships in ground beef patties. *Journal of Food Science.* **59** (3): 465-470.
- Hamm, D. R. 1970. Properties of meat protein. In Lawrie, R. A. *Proteins as human food*. Pg. 170-179. London: Butterworths.
- Hirata, A., Wang, F. C., Kimura, T. & Ohtake, Y. 1988. Fatty acid composition of lipids of meats and various internal organs from culled laying hen. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakaishi.* **35** (3): 204-209
- Hoffman, L. C. & Fisher, P. 2000. Comparison of meat quality characteristics between young and old ostriches. *Meat Science* **59**: 335-337
- Ismail, M., Manickam, E., Danial, A. D., Rahmat, A. & Yahay, A. 2000. Chemical composition and antioxidant activity of *Strobilanthes crispus* leaf extract. *J. Nutr Biochem.* **11**: 536-542.
- Kondaiah, N., Panda, B. 1988. Effect of live weight dressed weight and age on the yields of carcass components from spent hens. *Indian J. animal Sci.* **58**: 246-252
- Lawrie, R. A 1991. *Meat Science.* 5th edition. Oxford: Pergamon Press.
- Nagai, H., Harada, M., Nakagawa, M., Tanaka, T., Gunadi, B., Setiabudi, M. L. \J., Uktolseja, J. L. A. and Miyata, Y, 1996. Effects of chicken extract on the recovery from fatigue caused by mental workload. *Applied Human Science.* **15**: 281-286.
- Sim, M. K. 1977. Effects of oral feeding of Brand's Essence of Chicken on the level of 5-Hydroxyindole acetic acid in the cerebrospinal fluid of the rat. *International Journal of Food Sci. and Nutritional* **48**: 113-117.
- Sturman, J. A. 1993. Taurine in development. *Physiol. Rev.* **73**: 119-147
- Utusan Malaysia. 2001. Pati ayam rangsang kecerdasan. 18 April: 2.

Wu, H. C. & Shiau, C. Y. 2002. Proximate composition, free amino acids and peptides contents in commercial chicken and other meat essences. *J. Food and Drug Analysis*. **10** (3): 170-177

APPENDIX

Table 1. Nutritional compounds of broiler and spent hen essence

Nutritional components	Broiler's essence	Spent hen's essence
Protein (%)	6.20 ^a	1.34 ^b
Fat (%)	2.62 ^a	1.52 ^b

^{a,b} – Means with different superscript for row are significantly different (p<0.05)

Table 2. Nutritional compounds of raw and cooked broiler and spent hen meat.

Nutritional components	Raw Broiler Meat	Raw Spent Hen Meat	Cooked Broiler Meat	Cooked Spent Hen Meat
Protein (%)	17.01 ^c	18.6 ^c	21.79 ^b	30.7 ^a
Fat (%)	1.86 ^a	0.99 ^c	1.45 ^b	1.39 ^b
Ash (%)	0.84 ^b	1.1 ^a	0.51 ^c	0.81 ^b
Moisture (%)	78.18 ^c	73.0 ^b	71.45 ^b	60.6 ^a

^{a-c} – Means with different superscript for row are significantly different (p<0.05)

Table 3. Color measurement of broiler's, spent hen and market product (Brand's).

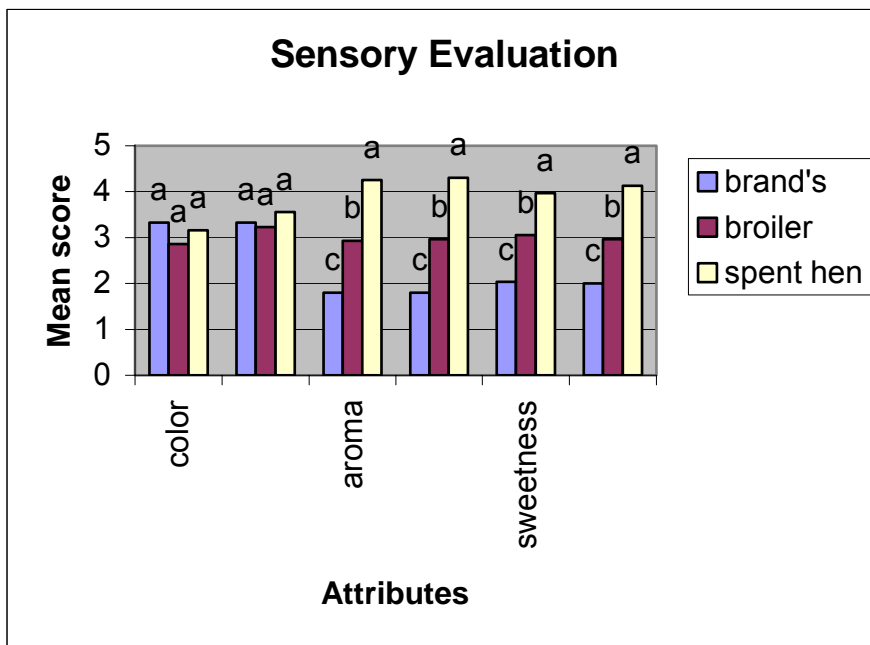
Color	Broiler's essence	Spent hen essence	Brand's essence
L (Lightness)	30.0 ^a	29.5 ^b	28.9 ^b
A (Redness)	1.45 ^a	0.35 ^c	0.89 ^b
B (Yellowness)	1.45 ^b	2.22 ^a	0.75 ^b

^{a-c} – Means with different superscript for row are significantly different (p<0.05)

Table 4. pH measurement of broiler's, spent hen and market product (Brand's).

Treatments	pH
Marketed products (Brand's)	6.04 ± 0.03 ^c
Broiler's essence	6.15 ± 0.03 ^b
Spent hen essence	6.20 ± 0.03 ^a

^{a-c} – Means with different superscript for row are significantly different (p<0.05)



^{a-c} – Means with different superscript for row are significantly different ($p < 0.05$)

Fig. 1. Sensory evaluation using hedonic scale of 1= most dislike.

The Chemistry and Materials of Polyurethane Synthesis

Eli Rohaeti

Jurdik Kimia FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta
Karangmalang Yogyakarta 55281
Telp. (0274)586168 Ext.215

Abstract

Polyurethane is a polymeric material which contains a urethane group (-NHCOO-) in the backbone of the macromolecule. The urethane groups are the product of the reaction between isocyanate and hydroxyl groups. This polymer material is one of the most important synthetic polymeric material in the market, with a wide variety of features such as sheets, fibers, foams, adhesives, and lacquers.

The basic building blocks for polyurethanes are isocyanates and polyols. The properties of polyurethanes depend largely on the building blocks, especially the kind of the polyol and isocyanate.

About 90% of the polyols used in polyurethane synthesis are hydroxyl-terminated polyethers. Saturated polyesters with terminal hydroxyl-groups are used to make both flexible and rigid polyurethane. Not only pure synthetic compounds but also various natural substances such as sucrose, molasses, lignin, and carbohydrates have been explored as possible polyol resources in the polyurethane synthesis. Those natural substances are natural materials having appropriate reactivity due to its functional groups such as hydroxyl groups. Blends of polyols are often used to obtain the best combination of processability, cost, and the properties of the final product. Several aromatic and aliphatic diisocyanates are available but some 95% of all polyurethanes are based upon the two aromatic diisocyanates, toluene diisocyanate (TDI) and diphenylmethane diisocyanate (MDI) and its derivatives.

Key words : *isocyanate, polyol, polyurethane, urethane.*

1. Introduction

Polyurethanes are all around us, playing a vital role in many industries, from shipbuilding to footwear, construction to cars. Rigid polyurethane foam is one of the most effective practical thermal insulation materials, used in applications ranging from buildings to the modest domestic refrigerator. Comfortable and durable mattresses and domestic seating are manufactured from flexible foam. Items such as shoe soles, sports equipment, car bumpers, are produced from polyurethane elastomers. Many of us rely on polyurethanes elastic threads of the material are found in underwear and other clothing.

Polyurethanes are by far the most versatile group of polymers, because products ranging from soft linear thermoplastic elastomers to

hard thermoset rigid foams are readily produced from liquid monomers. Polyurethanes are divided into three broad groups : flexible foam, rigid foam, and elastomers. (Ulrich, 1982 : 83)

All polyurethanes are based on the exothermic reaction of polyisocyanates with polyol molecules, containing hydroxyl groups. Relatively few basic isocyanates and a range of polyols of different molecular masses and functionalities are used to produce the whole spectrum of polyurethane materials.

There is a fundamental difference between the manufacture of polyurethanes and many other plastics materials. The majority of thermoplastics, unlike most polyurethanes, are polymerized in large chemical factories and then sold to the user as polymer granules or

powders. These are then converted to useful articles by one of the thermoplastic processing techniques which involve heating, shaping the melted polymer under pressure, and cooling. The properties of articles made in this way are almost entirely dependent upon the properties of thermoplastic polymer purchased from the manufacturer. The polymerization of most polyurethanes, however, is carried out by the converter and not by the chemical manufacturer. The latter sells polyurethane chemical components, usually in the form of liquids, and provides advice and information to enable the customer to make the polyurethane by mixing the chemical components in specified proportions.

The exceptions are some polyurethane elastomers which are made by the chemical manufacturers. These include elastomeric polyurethane fibres (spandex fibres), which are sold directly to textile manufacturers, and thermoplastic polyurethane elastomers, which are supplied in granular or sheet form for conversion into articles by injection moulding, extrusion, blow-moulding, calendaring, lamination or some other established thermoplastic conversion process.

MAKING POLYURETHANES FROM ISOCYANATES AND POLYOLS

The basic building blocks for polyurethanes (PU's) are diisocyanates and macroglycols, also called polyols. The commonly used isocyanates are tolylene diisocyanate (TDI), diphenylmethane diisocyanate (MDI) and polymeric isocyanate (PMDI) mixtures manufactured by phosgenating polyamines derived from the acid-catalyzed condensation of aniline with formaldehyde. MDI and PMDI are coproducts, and separation is achieved by distilling part of the MDI from the reaction mixture.

A major method of varying the properties of the final polyurethane (PU) is by varying the type of isocyanate used. Isocyanates may be modified in many ways to give products with differing physical and chemical properties. Several aromatic and aliphatic isocyanates are available, but about 95 percent of all PU's are based on two of them. These are TDI, MDI and its derivatives. Such polyisocyanate mixtures can be processed further to give a variety of compositions, known as MDI variants, which have a wide range applications. The

polyisocyanate mixtures are formulated to offer a range of differing functionalities. Functionality is defined as the average number of chemically-reactive groups on each individual molecule present. Table 1 shows that the functionalities of the products available range from 2.0 to about 3.0.

Some 90 percent of the polyols used in making PU's are polyethers with terminal hydroxyl groups. Hydroxyl-terminated polyesters are also used to obtain PU's with special properties. Polyesters are usually more expensive than polyethers, but competitively priced polyesters (made from recovered diacids), have been developed, particularly for use in making rigid foams.

The choice of polyol, especially the size and flexibility of its molecular structure and its functionality (the number of isocyanate-reactive hydroxyl groups per molecule of polyol) controls, to a large extent, the degree of cross-linking achieved in the polymer that is formed in the reaction with the polyisocyanate. That degree of cross-linking has a dominant effect on the stiffness of the polymer. To obtain a rigid foam there must be a stiff polymer network and, hence a high degree of cross-linking; for flexible foam a proportionally lesser degree of cross-linking is needed. Table 2 shows the characteristics of the polyols to make the two principal classes of PU's.

Most polyols and polyisocyanates used in the manufacture of PU's are liquid at ambient temperatures (ca. 18°C) and are easily handled. The reactions which produce a solid polymer are rapid and substantially complete within two minutes. The solid product can generally be handled within five minutes from the start of mixing, although rates can be varied enormously by the choice of catalyst and its concentration. The reaction are exothermic-the heat generated may be used to vaporize a liquid 'blowing agent' such as a fluorocarbon, when the reacting chemicals will polymerize and expand to produce a PU foam. Alternatively, some water may be incorporated in the polyol so that it reacts with the polyisocyanate to release carbon dioxide gas.

A urethane group is formed by the chemical reaction between an alcohol and an isocyanate. PU's result from the reaction between alcohols with two or more reactive hydroxyl groups per

molecule (diols or polyols) and isocyanates that have more than one reactive isocyanate group per molecule (a diisocyanate or polyisocyanate). This type of polymerization is called addition polymerization.

There have been considerable research put forth to develop an understanding of the property-structure relationships in segmented PU's (Huang and J. Lai, 1997 : 1563). A series of hydroxyl terminated polybutadiene (HTPB) based PU's were synthesized by solution polymerization with different types of diisocyanates, hard segment contents, NCO/OH ratio and polymerization methods. Spectroscopic and stress-strain studies were carried out to elucidate the structure-property relationships existing in these polymers. It was found that the binding of the hard segment and the flexibility of soft segments had subtle effects on the properties of stress-strain at break. The segregation between hard and soft segments was manifested by incompatibility between hard and soft segments, steric hindrance of urethane groups, and the extent of interchain hydrogen bonding, which affects the segregation and hence the stress-strain property of the prepared films. Films with higher hard segment content and NCO/OH ratio, MDI and the one-stage polymerization method exhibit higher stress at break and lower strain at break. The higher value of hydrogen bonding index (HBI) was observed for higher NCO/OH values, hard segment content and one-stage PU's. The degree of segregation and strain at break are increased as the HBI value decreased. PU's with mixed diisocyanates of MDI and IPDI (isophorone diisocyanate) exhibit lower stress at break than that with the single diisocyanate of MDI-based PU's.

Temperature control and conditioning

The viscosity, density, and chemical reactivity of the polyols and the isocyanates vary with the temperature. Controlling the temperature of the chemical components is therefore essential to the reproducible processing of PU's. Changes in temperature may not only change the rate at which the PU polymerization takes place, but they may also affect the quality of the final product.

In general increasing temperature promotes faster urethane elastomer formation and also controls its structure. Three general

temperature ranges are used in fabrication from liquid reactants:

- a) ambient to 50⁰C, used for one shot and simple pouring process;
- b) 50 – 100⁰C, prepolymer and quasi-prepolymer processes;
- c) greater than 120⁰C, synthesis of linear (thermoplastic) urethanes.

In general as the temperature increases progressively to 140⁰C all reaction rates tend to converge, hence favouring cross-linking reactions and especially biuret crosslinking. As velocity rates with the various urethane reactants change with temperature, the need for good temperature control in obtaining a consistent product becomes obvious.

Increased temperature also has an important effect on the properties of the cured polymer since both the allophanate and biuret linkages tend to dissociate at higher temperatures giving a more linear polymer. Some results are given in Table 3.

The conditioning of the chemicals before use is done in various ways depending on the scale of manufacture and the temperature requirements of the particular process. Some processes, such as elastomer manufacture from isocyanates and polyols that are solid at room temperature, may be operated at elevated temperatures. But most PU's are made from isocyanates and polyols that are liquid at room temperature. Many of these of PU processes may be initiated by adjusting the catalyst level at any convenient temperature ranging from about 15⁰C to about 30⁰C, although there is often an optimum range of temperatures that gives the best product or the lowest costs.

Polyurethanes from plant components

Natural polymers are materials which are highly adaptable to their circumstances. They are also materials having appropriate reactivity because of functional groups such as hydroxyl groups. Natural polymers having more than two hydroxyl groups per molecule can be used as polyols for PU synthesis.

(Hatakeyama, et al., 1995 : 743)

The core structure of prepared PU's consists of saccharide and lignin linked by urethane bonding. It can be assumed that the PU's obtained are essentially copolymers having

three-dimensional networks of urethane bonding which have saccharide and lignin component combined with polyol (PEG or PPG).

PU films and foams having a variety of thermal and mechanical characteristics were derived from molasses, lignin, woodmeal, and coffee grounds. The glass transition temperature and the strength at break of PU increased with increasing amounts of plant components in PU, since glucose and lignin residues act as hard segments in the PU molecular networks.

Sucrose is one of the world's most abundant organic chemicals and it is available in a state of high purity and at low cost. Its uses in the preparation of PU's have been extensively reviewed by Jhurry (1997). These PU's are mostly crosslinked and therefore insoluble. They have not been well characterized as far as their structure and physical properties are concerned. A crosslinked PU was obtained, suggesting that the polymerization not only involves participation of the remaining primary hydroxyl group in the 1' position, but also that of secondary hydroxyls. Crosslinking was avoided by operating with a ratio of diisocyanate to 6,6'-dichlorosucrose equal to 0.98. Indeed, the PU obtained is soluble in DMAc and in water. Analysis of its ¹³C NMR spectrum shows that the signals corresponding to carbons of the saccharide moieties are split into doublets, again indicating that the polymerization does not proceed selectively. This result seems to confirm that the PU's do not possess linear structures.

The properties of polyurethane depend largely on building blocks, especially the kind of polyol, and range widely from soft thermoplastic elastomers to hard thermoset rigid foams, as variety of products such as rubbery fibres, elastic foams, adhesives and lacquers are seen in the markets. Not only neat synthetic compounds but also various natural substances have been explored as possible resources of polyol. The effect of adding tapioca starch on the thermal properties of polyethylene glycol (PEG) and diphenylmethane diisocyanate (MDI) based polyurethane was studied by measuring the glass transition temperature (T_g) and the degradation temperature. (Eli Rohaeti, N. M. Surdia, C. L. Radiman, and E. Ratnaningsih, 2000 : 313)

Mixtures of PEG and various content of food grade tapioca starch (0, 5, 10, 15, and 20wt%) were allowed to react with MDI, and functional groups in resultant polyurethane were analyzed by FTIR spectrophotometer. Differential thermal analysis was conducted with DTA-General V4.1C du Pont 2000 at the heating rate of 10°C/min.

The polyurethane prepared did not melt but degraded at high temperature. The T_g increased with the content of starch, suggesting that starch residue acted as hard segments, whereas the degradation temperature decreased with the increase of starch.

4. Conclusion

The basic building blocks for polyurethanes are diisocyanates and polyols. The properties of polyurethanes depend largely on the building blocks, especially the kind of the polyol. Not only pure synthetic compounds but also various natural substances such as lignin and carbohydrates have been explored as possible polyol resources in the polyurethane synthesis. Those natural substances are natural polymeric materials having appropriate reactivity due to its functional groups such as hydroxyl groups. Natural polymers having more than two hydroxyl groups per molecule can be used as polyols for polyurethane preparation if the polyols can be reacted efficiently with isocyanates.

5. References

- Eli Rohaeti, N.M. Surdia, C.L.Radiman, E.Ratnaningsih (2000), Thermal properties of synthesized polyurethane with tapioca starch, *Proceedings of The Second International Workshop on Green Polymers*, Indonesian Polymer Association, 313-316.
- Hatakeyama, H., S. Hirose, T. Hatakeyama, K. Nakamura, K. Kobashigawa, N. Morohoshi, (1995), Biodegradable Polyurethanes from Plant Component, *J. Pure Applied Chemistry*, A 32(4), 743 – 750.
- Hepburn, C. (1982), *Polyurethane Elastomers*, Applied Science Publishers, USA, 81 – 87.
- Huang, S. L. and J. Lai (1997), Structure-Tensile Properties of Polyurethanes, *Eur. Polym. J.*, 33, 10 – 12, 1563 – 1567.
- Jhurry, D. (1997), Sucrose-Based Polymers : Polyurethanes with Sucrose in the Main Chain, *Eur Polym. J.*, 33, 10 – 12, 1577 – 1582.

Eli Rohaeti

Ulrich, Henrie (1982), Polyurethane, dalam Ulrich, Henrie (1982), *Polyurethane, Introduction to Industrial Polymers*, Hanser Publishers, New York, 83 – 88.

Woods, George (1987), *The ICI Polyurethanes Book*, John Wiley & Sons, New York, 1 – 15.

Karakterisasi Dna Polimerase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Lokal

I N. Tika*, M.Sindumarta** dan Akhmaloka**

* Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan Negeri Singaraja

**Departemen Kimia, FMIPA ITB

Jl. Ganesha 10 Bandung

Abstrak

Karakterisasi DNA Polimerase termotabil dari bakteri termofilik *Bacillus thermophilus ssp1* (DNA Pol BTC16). Telah dilakukan optimasi pH, suhu, variasi Mg^{+2} , $[Mn^{+2}]$ and $[K^+]$. Hasil karakterisasi menunjukkan aktivitas polimerase tertinggi ditunjukkan pada pH 7,8, suhu 80°C, $[Mg^{+2}] = 3$ mM, $[Mn^{+2}] = 3$ mM dan $[K^+] = 25$ mM. Kinetikan reaksi enzim menunjukkan V_{maks} terhadap dNTP sebesar 1,15 unit mg^{-1} , K_m sebesar $1,37 \times 10^{-4}$ M dan k_{cat} sebesar $1,55 \times 10^{-2}$ detik⁻¹ serta $k_{cat} / K_m = 11,31 \times 10^1$ detik⁻¹ M⁻¹. Aktivitas DNA Pol BTC16 dapat diinhibisi oleh aphidicolin dan N-etilmaleimida (NEM), dengan nilai IC_{50} berturut-turut 9,35 $\mu g/mL$ dan 32,89 $\mu g/mL$. Dari data-data kinetika di atas serta efek inhibitor oleh aphidicolin dan N-etilmaleimida menunjukkan bahwa DNA Pol BTC16 mempunyai kemiripan sifat dengan DNA Pol kelas B dan mempunyai residu sistein pada sisi katalitiknya.

Paper is not available



Pollution sources and their effects on drinking water quality: A case study of Semenyih River Basin

Md Pauzi Abdullah and Soh Shiau Chian

School of Chemical Sciences & Food Technology, Faculty of Science and Technology, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, e-mail address: mpauzi@pkriscc.chem.ukm.my

Abstract

Semenyih River is the main source of raw water for the Semenyih Water Treatment Plant (SWTP). The SWTP, with the production capacity of 150 MGD, supplies treated water to the new administrative centre of Putrajaya in addition to areas of Cyberjaya, Bandar Baru Bangi, Sepang, KLIA and USJ. The river basin has experienced rapid development since the last decade in line with the development of new Kuala Lumpur International Airport (KLIA), the Airport City, the Cyberjaya and the Multimedia Supercorridor that has resulted in the degradation of the water quality. This is further compounded by newer proposed development programmes within the Kajang-Semenyih Corridor and the Bangi-Beranang Corridor which will not only increase the environmental load but also creating inflating demand for clean water. A study was carried out to determine the extent of the basin water quality degradation and their impacts on the quality of the treated water produced by the SWTP. In addition to common water quality parameters, the levels of microorganics namely trihalomethanes and other volatile organic compounds (VOCs) were determined. This study has shown that VOCs are present in the treated water, ranges from undetectable to 104.3 µg/l. This may be attributed to the presence of precursor substances in the raw water and the chlorination practices used by the SWTP. Analysis of the raw water quality at selected sampling locations also showed significant variations in the physical, biological and chemical characteristics as the river flows down stream indicating the impacts of the varied landuse. The decline in raw water quality and the findings of anthropogenic chemicals, shows that better catchment management is badly needed.

Paper is not available



Analisis Sampel Partikulat Udara Menggunakan Metode K0 - Analisis Aktivasi Neutron

Muhayaturun

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknik Nuklir, BATAN, Jalan Tamansari 71, Bandung, 40132, Indonesia, e-mail: hayat@bdg.centrin.net.id

Abstrak

Analisis aktivasi neutron menggunakan pembandingan multielemen merupakan suatu metode yang umum digunakan untuk analisis multielemen. Metode tersebut memerlukan waktu preparasi lama dan biaya besar. Meskipun SRM (standard reference material) telah sering digunakan sebagai standar pembandingan, tetapi pada beberapa keadaan menghasilkan nilai yang berbeda. Pada keadaan tertentu juga tidak mungkin untuk membandingkan kondisi iradiasi standar dan sampel jika terjadi ketidak homogenan fluks. Untuk mengatasi berbagai keterbatasan tersebut, perlu digunakan metode standardisasi K0 - analisis aktivasi neutron (K0-AAN). Penelitian metode standardisasi K0 merupakan suatu lingkup penelitian yang luas, melibatkan berbagai parameter yang spesifik untuk suatu jenis reaktor tertentu dan membutuhkan waktu yang lama. Pada penelitian ini telah dilakukan analisis beberapa sampel partikulat udara menggunakan metode K0-AAN pada fasilitas reaktor HWRR (heavy water research reactor) di Beijing China. Iradiasi sampel untuk nuklida yang berumur paruh pendek dilakukan pada masing-masing sampel selama 5 menit. Pencacahan hasil iradiasi pendek dilakukan selama 5 menit setelah dead time berada pada nilai dibawah 10%. Iradiasi sample untuk nuklida yang berumur paruh panjang dilakukan selama 2 hari dengan waktu tunda 2-3 hari. Analisis dilakukan menggunakan program SPAN dan ADV-NAA. Hasil analisis iradiasi pendek dan panjang masing-masing menunjukkan 13 unsur dan lebih dari 17 unsur dapat terdeteksi. Sejumlah unsur yang dapat terdeteksi seperti antara lain sebagai berikut: Ti, I, Br, Mg, Mn, Cu, Na, V, K, Cl, Al, Ca, S, Nd, Sm, Mo, Au, As, Sb, La, Ce, Lu, Se, Th, Cr, Yb, Hf, Cs, Sc, Rb, Fe, Zn, Co dan Eu. Dibandingkan dengan analisis aktivasi neutron menggunakan metode relatif yang hanya mampu mendeteksi sekitar 20 unsur, maka penggunaan metode K0 sangat diperlukan dalam pengembangan metode AAN, sehingga dapat lebih mengefisienkan waktu, tenaga dan biaya dalam melakukan analisis multielemen.

Paper is not available

Sertifikasi larutan standar logam, cadmium, timbal dan merkuri dengan metode titrasi kompleksometri EDTA

Nuryatini¹⁾ dan Sumardi²⁾

1) Pusat Penelitian Kimia –LIPI
Kawasan Puspiptek, Serpong –Tangerang, 15314, Indonesia
e-mail : n_nuryatini@yahoo.com

2) Pusat Penelitian Kimia-LIPI
Jln cisu /Sangkuriang ,Bandung, 40135, Indonesia

ABSTRAK

Dalam sertifikasi bahan acuan larutan standar logam Timbal (Pb), cadmium (Cd) dan Merkuri (Hg) untuk analisis unsur logam diperlukan metode yang handal dan tertelusur ke Standar Nasional/ Internasional satuan ukuran. Metode titrasi kompleksometri merupakan metode yang cukup handal dan pada prinsipnya adalah metode primer yang tertelusur ke Standar Nasional/ Internasional satuan ukuran. Pada sertifikasi ini metode titrasi kompleksometri dilakukan secara otomatis dengan larutan standar Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) dan detektor fotometri. Untuk penentuan Cd dilakukan pada pH 6 dengan indikator xilenol orange, pada panjang gelombang 550 nm. sedangkan untuk analisis Pb dilakukan pada pH 10 dengan indikator Eriochrom Black T (EBT) pada panjang gelombang 660 nm dan untuk analisis Hg dilakukan pada pH 6 dengan indikator xilenol orange pada panjang gelombang 550 nm.

Validasi metode untuk penentuan Larutan Cd, Pb dan Hg ini telah dilakukan dengan hasil sebagai berikut :

Akurasi metode pada analisis larutan standar Cd (NIST-SRM 3108) memberikan nilai perolehan kembali (recovery) 99,46 % dengan deviasi standar (n=4) adalah 0,21%, sedangkan untuk analisis larutan Pb (NIST-SRM 3128) memberikan nilai 99,56 % dengan deviasi standar (n=8) adalah 0,12 % dan untuk analisis larutan standar Hg (NIST-SRM 3133) adalah 99,56% dengan deviasi standar (n=6) adalah 0,16 %. Presisi metode ditentukan dengan cara pengukuran contoh sebanyak 7 kali pengulangan, dan hasil yang diperoleh memberikan nilai standar deviasi relatif (RSD) = 0,046 % untuk analisis Cd; 0,12 % untuk analisis Pb dan 0,18 % untuk analisis Hg. Metode ini memberikan hasil yang linier antara 4 sampai 20 mL untuk larutan Cd (1000 mgr /L), 5 sampai 30 mL untuk larutan Pb (1000 ppm) dan 4 sampai 30 mL untuk larutan Hg (1000 mgr/L). Ketiga metode tersebut tidak memberikan kesalahan sistematik yang cukup berarti serta mempunyai limit kuantitasi = 3,5 mg untuk Cd, 6,0 mg untuk Pb dan 5,0 mg untuk Hg.

Hasil analisis contoh kandidat bahan acuan untuk larutan Cd = 999 ± 6 mg/mL, untuk kandidat bahan acuan larutan Pb = 1000 ± 7 mg /L dan untuk larutan Hg = 1007 ± 8 mg/L.

Kata Kunci : Larutan standar logam Sertifikasi, Titrasi kompleksometri, Validasi metode.

I. PENDAHULUAN

Sertifikasi merupakan tahap yang sangat penting dalam pembuatan bahan acuan, oleh karena itu pemilihan metode analisis yang akan digunakan untuk sertifikasi merupakan hal yang sangat penting. Nilai yang dicantumkan dalam sertifikat suatu bahan acuan harus memiliki akurasi yang tinggi, tertelusur ke standar nasional / internasional satuan

ukuran dan memiliki ketidakpastian pengukuran yang rendah.

Metode titrimetri pada prinsipnya adalah metode yang berdasarkan atas reaksi kimia bukan berdasarkan perbandingan dengan suatu bahan standar sehingga metode ini akan tertelusur ke standar nasional/ internasional

satuan ukuran dan akan memberikan nilai ketelitian dan ketepatan yang tinggi.

Berdasarkan prinsip tersebut diatas maka metode titrimetri termasuk metode primer yang sangat sesuai jika digunakan pada penentuan konsentrasi untuk sertifikasi bahan acuan..Penentuan titrimetri untuk larutan ion logam yang telah dikenal sejak lama adalah metode titrasi kompleksometri dengan menggunakan EDTA sebagai larutan pentitrasi.

Metode ini telah digunakan untuk analisis berbagai unsur logam yang mana setiap logam memerlukan kondisi titrasi yang spesifik. Pada penelitian ini metode titrasi kompleksometri untuk logam Cd,Pb dan Hg akan digunakan untuk sertifikasi bahan acuan larutan standar logam tersebut.

Berbagai metode titrasi kompleksometri dapat digunakan untuk penentuan ion Cd ,Pb maupun Hg (Meites L,1962). Diantaranya adalah metode penentuan Cd dengan titrasi kompleksometri menggunakan indikator Xylenol orange pada pH 6, metode penentuan Pb dengan indikator EBT pada pH 10 dan metode penentuan Hg dengan indikator xylenol orange pada pH 6. Metode ini dipilih karena memberikan perubahan warna yang cukup tajam pada titik akhir titrasi sehingga diharapkan dapat memberikan nilai presisi dan akurasi yang tinggi.

Untuk mengetahui unjuk kerja dari metode perlu dilakukan validasi metode yang bertujuan untuk melengkapi bukti bukti yang objektif apakah metode tersebut memenuhi. persyaratan yang ditetapkan dan sesuai dengan tujuan dari pengujian tersebut. Dalam validasi metode ini ada 6 langkah yang dilakukan yaitu penentuan akurasi, presisi, kesalahan sistematik , linearitas dan limit kwantitasi.(Toledo M) serta perhitungan ketidakpastiannya.

Dalam makalah ini akan dibahas tentang validasi ketiga metode tersebut ,serta penerapannya dalam analisis /sertifikasi kandidat bahan acuan larutan standar logam.

II. BAHAN DAN METODE

II.1.Bahan Kimia

Semua bahan kimia yang digunakan adalah murni (p.a) yang terdiri dari : amoniak , amonium klorida, asam tartrat, asam nitrat, heksametilentetramin, EDTA , EBT. dan

xylenol orange. Bahan acuan bersertikat (SRM) larutan Zn^{2+} (NIST 3168 a) , larutan standar Pb^{2+} (NIST 3128), Larutan standar Cd^{2+} (NIST -3108) , Larutan Standar Hg (NIST -3133).

II.2. Contoh yang diuji

Kandidat bahan acuan larutan standar Cd, Hg dan Pb di dalam HNO_3 0,5 N

II.3. Peralatan

Timbangan analitik, Automatic titrator merk Mettler Toledo DL 77 , Phototrode DP 660, DP550, Buret piston dan alat-alat gelas lainnya

II.4. Pembuatan Pereaksi dan Larutan Standar

II.4.1 Pembuatan larutan EDTA 0,02 M

Ditimbang dengan teliti 7,44 gram EDTA di dalam botol timbang , dilarutkan dengan akua nanopore kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 1 Liter dan di encerkan sampai tanda batas dengan akua nanopore . Larutan tersebut ditempatkan didalam botol polietilen atau di dalam botol gelas yang telah direndam dalam larutan EDTA 0,2 % panas selama 3 jam

II.4.2. Pembuatan larutan standar Zn^{2+} 0,02 M dari SRM NIST 3168 a

Ditimbang dengan teliti 13,2313 gram larutan standar Zn^{2+} (SRM NIST 3168 a) di dalam labu takar 100 mL , kemudian diencerkan dengan HNO_3 0,5 M sampai tanda batas

II.4.3. Pembuatan Larutan standar Pb^{2+} dari SRM NIST 3128

Ditimbang dengan teliti 27,6757 gram larutan standar Pb^{2+} (SRM NIST 3128) , kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 250 mL, dan diencerkan dengan asam nitrat 0,5 N sampai tanda batas.

II.4.4. Pembuatan larutan standar Cd dari SRM NIST 3108

Ditimbang dengan teliti 9,878 gram larutan standar Cd^{2+} (SRM NIST 3108) , kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, dan diencerkan dengan asam nitrat 0,5 N sampai tanda batas

II.4.5. Pembuatan larutan standar Hg dari SRM NIST 3133

Ditimbang dengan teliti 24,9719 gram larutan standar Hg^{2+} (SRM NIST 3133) , kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 250 mL, dan diencerkan dengan asam nitrat 0,5 N sampai tanda batas.

II.4.6. Pembuatan larutan buffer pH 10

Larutan amoniak pekat sebanyak 570 mL ditambah dengan 70 gram amonium klorida, kemudian diencerkan dengan akuades sampai 1 Liter.

II.4.7. Pembuatan larutan asam tartrat 20 %

Ditimbang 20 gram asam tartrat, kemudian dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

II.4.8. Pembuatan Larutan heksametilen tetramin 30 %

Ditimbang 30 gram heksametilen tetramin, kemudian dilarutkan dalam akuades dan diencerkan sampai 100 mL.

II.4.9. Larutan Xylenol orange

Di timbang 0,1 gram Xylenol orange, kemudian diencerkan dengan akuades sebanyak 100 mL

II.5 Metode Pengujian

II.5.1. Standarisasi larutan EDTA dengan larutan standar Zn^{2+}

II.5.1.1 Larutan standar Zn^{2+} yang telah dibuat di atas, dipipet sebanyak 8 mL, dimasukkan ke dalam beaker, kemudian ditambah 5 mL larutan buffer pH 10 dan sedikit indikator EBT.

II.5.1.2 Larutan tersebut dititrasi dengan EDTA menggunakan otomatis titrator, dengan sensor photometer pada panjang gelombang 660 nm, sampai tercapai titik akhir titrasi.

II.5.1.3. Dihitung konsentrasi (M) EDTA = $8 \times M Zn^{2+} / V_{EDTA}$

II.5.2. Penentuan Cd dalam larutan standar

II.5.2.1. Dipipet 20 mL larutan standar Cd (II.4.4)

II.5.2.2. Ditambah larutan Heksamethylen Tetramin (II.4.8) sampai pH larutan $6 \pm 0,2$

II.5.2.3. Ditambah 0.5 mL indikator Xylenol orange (II.4.9)

II.5.2.4. Dititrasi dengan larutan standar EDTA (0,02 M) secara fotometri pada panjang gelombang 660 nm sampai titik akhir titrasi (terjadi perubahan warna)

II.5.3. Penentuan Pb dalam larutan standar

II.5.3.1 Dipipet 30 mL larutan standar Pb (II.4.3)

II.5.3.2. Ditambah 2 mL asam tartrat (II.4.7)

II.5.3.3. Ditambah 5 mL buffer pH 10 dan sedikit EBT

II.5.3.4..Dititrasi dengan larutan standar EDTA (0,02 M) secara fotometri pada panjang gelombang 550 nm sampai titik akhir titrasi .(terjadi perubahan warna).

II.5.4. Penentuan Hg dalam larutan standar

II.5.4.1 Dipipet 30 mL larutan standar Hg (II.4.3)

II.5.4 2. Ditambah Heksa metilen tetra min sampai pH $6 \pm 0,2$

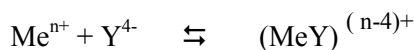
II.5.4 3. Ditambah 0,5 mL indikator Xylenol orange (II.4. 9)

II.5.4.4. Dititrasi dengan larutan standar EDTA (0,02 M) secara fotometri pada panjang gelombang 660 nm sampai titik akhir titrasi .(terjadi perubahan warna).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan ion logam secara titrasi kompleksometri dilakukan dengan menggunakan larutan standar Etilen Diamin Tetra Asetat atau disingkat EDTA.

Reaksi yang terjadi antara larutan EDTA dengan ion logam secara umum dinyatakan sebagai berikut (Day R.A,Jr and Anderwood R.A ,1980)

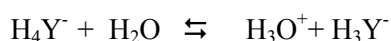


Dimana : Me^{n+} adalah ion metal (logam)

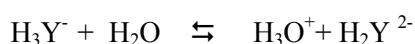
Y^{4-} adalah ion EDTA

$(MeY)^{(n-4)+}$ adalah kompleks logam dengan EDTA

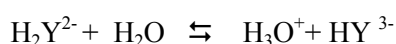
Akan tetapi EDTA yang sering disingkat sebagai H_4Y mempunyai 4 tetapan disosiasi asam yaitu :



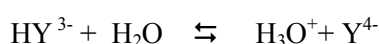
$$K_{a1} = 1,02 \times 10^{-2}$$



$$K_{a2} = 2,14 \times 10^{-3}$$



$$K_{a3} = 6,92 \times 10^{-7}$$



$$K_{a4} = 5,50 \times 10^{-11}$$

Dari reaksi diatas dapat dilihat bahwa, ion ion yang berada dalam larutan EDTA tersebut

dipengaruhi oleh pH dari larutan. Pada pH yang tinggi (kira kira 12) kebanyakan EDTA ada dalam bentuk tetraanion (Y^{4-}), sedangkan pada pH yang lebih rendah ada dalam bentuk HY^{3-} . Dengan demikian kondisi pH dari larutan perlu diperhatikan pada titrasi ini. Selain kondisi pH yang perlu diperhatikan juga adalah adanya kemungkinan terbentuknya senyawa kompleks lain yang bereaksi dengan logam atau pun indikator yang digunakan yang dapat mengganggu pada titik akhir titrasi. Berbagai kondisi titrasi dari berbagai logam telah dilakukan dan dapat dilihat pada literatur (Meites L,1962). Pada penelitian ini telah dipilih metode penentuan logam Cd dengan menggunakan indikator Xylenol orange pada pH 6, metode penentuan Pb dengan indikator EBT pada pH 10 dan metode penentuan Hg dengan indikator Xylenol orange pada pH 6. Metode metode tersebut di atas telah divalidasi untuk keperluan sertifikasi bahan acuan. Dalam validasi metode ini telah dilakukan pengujian terhadap presisi (repetabilitas), akurasi, limit kuantitasi,, linieritas, kesalahan sistematik dan perhitungan ketidakpastian pengujian dari masing-masing logam. Hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut

III.1 Penentuan akurasi metode :

Akurasi metode diuji dengan cara menganalisis larutan standar yang diketahui konsentrasinya (SRM) yang mana pada penelitian ini digunakan SRM dari NIST yaitu SRM No 3108 untuk analisis Cd, SRM No 3128 untuk analisis Pb dan SRM No 3133 untuk analisis Hg dengan konsentrasi dari masing masing standard tersebut adalah $9,12 \pm 0,03$ mg/g Cd ; $9,98 \pm 0,03$ mg/g dan $10,00 \pm 0,02$ mg/g.

Dari hasil analisis SRM, akurasi metode ditunjukkan oleh nilai perolehan kembali (recovery), yaitu,

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Hasil analisis}}{\text{Nilai SRM}} \times 100\%$$

Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 1.:

Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ketiga metode tersebut cukup akurat dengan recovery mendekati 100%.

III.2. Penentuan repetabilitas (presisi)

metode :

Dalam penentuan repetabilitas dilakukan dengan cara menganalisis contoh kandidat bahan acuan yang dibuat oleh PP-Kimia –LIPI dengan konsentrasi kurang lebih 1000 mg/L sebanyak minimal 7 kali kemudian ditentukan deviasi standar ny (SD). Pada percobaan ini dilakukan pengamatan terhadap mL larutan peniter yang digunakan. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ketiga metode tersebut mempunyai ketelitian yang baik dengan nilai RSD berturut turut untuk analisis Cd, Pb dan Hg adalah 0,046 %, 0,12 % dan 0,18 %.

III.3. Penentuan limit kuantitasi.

Dalam penentuan limit kuantitasi ini dititrasi sejumlah larutan yang masing masing mengandung Cd, Pb dan Hg dimana kandungan logam tersebut divariasikan dari besar menjadi semakin kecil. Setiap konsentrasi dianalisis sebanyak 7 kali pengulangan, dan ditentukan nilai RSD nya.. Selanjutnya ditentukan berapa mg logam logam tersebut yang repetabilitas titrasinya sudah melampaui batas nilai RSD yang masih diterima. Untuk mendapatkan nilai tersebut dibuat kurva hubungan antara mg ion logam tersebut terhadap nilai RSD seperti gambar 1 berikut ini

Dimana limit kuantitasi dapat dihitung dari kurva tersebut yaitu, konsentrasi contoh yang memberikan nilai RSD =0,30 %.

Dari kurva tersebut diatas diperoleh bahwa limit kuantitasi untuk Cd adalah 3,5 mg (0,031 mmol), Pb =6 mg (0,0289 mmol) dan Hg = 5,0 mg (0,0249 mmol)

III.4. Penentuan kesalahan sistematik :

Penentuan kesalahan sistematik dilakukan dengan cara melakukan titrasi pada berbagai jumlah mL ion logam, kemudian dibuat kurva antara mL ion logam yang dititrasi terhadap mL titran dan ditentukan persamaan garis regresinya. Titrasi dikatakan tidak memberikan kesalahan sistematik yang cukup berarti apabila nilai intersep (a) dari persamaan garis regresi $\leq 15 \mu\text{L}$.

Data hasil percobaan penentuan kesalahan sistematik untuk ketiga metode diatas dapat dilihat pada Gambar 2.

Diperoleh persamaan garis linier sebagai berikut

$$Y_{Cd} = 0,4086X - 0,009 \text{ dengan nilai } r = 0,99999$$

$$Y_{Pb} = 0,2414X - 0,015 \text{ dengan nilai } r = 0,99999$$

$$Y_{Hg} = 0,2520X + 0,015 \text{ dengan nilai } r = 0,9998$$

Dari hasil diatas menunjukkan bahwa pada titrasi ini tidak terjadi kesalahan sistematik yang cukup berarti .karena nilai a dari masing masing kurva berturut turut adalah 9 , 15 dan 15 μ L

III. 5. Penentuan Linieritas

Linieritas dinyatakan sebagai rentang konsentrasi dari suatu metode yang akan memberikan nilai yang benar apabila dilakukan pada rentang konsentrasi tersebut. Untuk menentukan linieritas ini dilakukan dengan cara melakukan titrasi pada berbagai ukuran contoh pada rentang tertentu

Ada 2 metode yang digunakan untuk menguji linieritas dari suatu metode titrasi yaitu :

Menentukan koefisien regresi (R) dari persamaan garis regresi yang dibuat dari kurva hubungan antara jumlah contoh yang dititrasi dengan mL titran . Nilai R yang harus dipenuhi tergantung pada ketepatan yang diinginkan . Biasanya nilai $R > 0,995$ menyatakan bahwa hubungan antara hasil titrasi dengan jumlah contoh adalah linier.

Menentukan slope dari persamaan garis regresi pada kurva hubungan antara mL contoh dengan 0konsentrasi yang diperoleh. Apabila nilai slope(b) $> 0,1 \%$ dinyatakan bahwa kurva tidak linier

Hasil percobaan penentuan linieritas ini dapat dilihat pada Gambar 3.

Diperoleh persamaan garis regresi sebagai berikut :

$$Y_{Cd} = 0,4035x + 910,90$$

$$Y_{Pb} = 0,3314x + 989,72$$

$$Y_{Hg} = 0,6321x + 993,07$$

Dari persamaan tersebut diatas diperoleh nilai b untuk Cd = 0,4 035 mg/L/mL , Pb = 0,3314 mg/L/mL dan Hg = 0,6321 mg/L /mL . Sedangkan dari gambar 2 diperoleh nilai r untuk Cd, = 0,99999 , Pb =0,99999 dan Hg = 0,9998. Hal ini menunjukkan bahwa untuk titrasi contoh larutan Cd dengan volume dari 4 s/d 20 mL, larutan Pb dengan volume dari 5 s/d 30 mL dan larutan Hg dengan volume dari 4 s/d

30 mL memberikan hubungan yang linier, yang berarti bahwa pada rentang volume contoh tersebut akan memberikan perbedaan hasil yang masih dapat diterima . Akan tetapi apabila kita lihat dari kurva pada Gambar 3 diatas terutama untuk analisis Pb dan Hg menunjukkan bahwa, pada volume yang rendah memberikan penyimpangan yang lebih besar dibandingkan volume yang lebih besar sehingga untuk analisis Pb dan Hg titrasi paling baik dilakukan antara 10 sampai 30 mL. Pada penelitian ini titrasi dilakukan dengan volume contoh yang maksimum yaitu 20 mL untuk Cd dan 30 mL untuk Hg dan Pb , hal ini dipilih agar ketidakpastian pengukuran menjadi lebih rendah.

Dari langkah langkah yang telah dilakukan pada validasi diatas maka diperoleh kondisi titrasi yang baik untuk digunakan dalam mensertifikasi kandidat bahan acuan.

Dalam suatu sertifikat bahan acuan perlu dicantumkan nilai dari ketidakpastian pengujiannya untuk itu maka perlu dilakukan perhitungan estimasi ketidakpastiannya

III.6. Penentuan Ketidakpastian Pengujian

Indikator kualitas hasil pengujian dapat diukur dengan suatu besaran yang disebut uncertainty (ketidakpastian) . Ketidakpastian pengujian adalah interval (kisaran) nilai di dalam mana nilai kuantitas yang diukur itu terletak , yang artinya di dalam mana nilai benar diperkirakan berada . Setiap faktor di dalam pengujian dapat menjadi sumber timbulnya ketidakpastian pengujian . Sumber sumber ketidakpastian pengujian dapat diperoleh dari sampling ,preparasi contoh, kalibrasi , kondisi lingkungan, pengaruh personil dan nilai bahan acuan. Untuk mendapatkan nilai ketidakpastian yang rendah perlu dipilih metode dan cara pengerjaan yang benar dengan memperhatikan sumber sumber kesalahan yang dapat memberikan kontribusi yang cukup berarti terhadap hasil ketidakpastian yang diperoleh. Untuk mengestimasi ketidakpastian pengujian ,pertama dilakukan dengan cara menyusun suatu model dari sistim pengujian yang diikuti dengan cara membuat daftar dari semua faktor yang dapat memberikan kontribusi kesalahan terhadap hasil akhir. Pada penelitian ini telah dihitung ketidakpastian pengujian pada analisis Cd,Pb dan Hg yang mengacu kepada (ISO Gum ,1993)dan (Eurachem

Guide,2000) Pada makalah ini cara menghitung ketidakpastiannya tidak akan dijelaskan tetapi contoh perhitungan untuk analisis Pb dapat dilihat pada tulisan sebelumnya pada literatur (Nuryatini, 2003)

Hasil yang diperoleh untuk analisis kandidat bahan acuan larutan standar Cd , Pb dan Hg dan nilai ketidakpastiannya adalah sebagai berikut :

No	Jenis Contoh	Konsentrasi (mg/L)
1	Larutan standar acuan Cd	999 ± 6
2	Larutan standar acuan Pb	1000 ± 7
3	Larutan standar acuan Hg	1007 ± 8

Nilai ketidakpastian baku yang diperoleh adalah $6/2=3$ (untuk Cd dan Pb) dan $7/2 = 3,5$ (untuk Hg), yang berarti nilai ketidakpastian baku < 1%, hal ini menunjukkan bahwa metode ini cukup baik untuk digunakan pada analisis bahan acuan.

IV.KESIMPULAN

- Titrasi kompleksometri secara otomatis dengan detektor fotometrik untuk analisis ion logam Cd, Pb dan Hg telah divalidasi dengan hasil yang baik , dan akan digunakan untuk sertifikasi bahan acuan larutan standar logam tersebut.
- Nilai ketidakpastian (U) yang diperoleh berkisar antara 0,6-0,8 %
- Konsentrasi larutan Cd,Pb dan Hg yang diperoleh dalam bahan acuan larutan standar logam logam tersebut adalah berturut turut : 999 ± 6 mg/L Cd ; 1000 ± 7 mg/L Pb dan 1007 ± 8 mg/L

V. DAFTAR PUSTAKA

1. Beck C.M, (1997) ,*Toward a revival of classical analysis*, Metrologia ,34,19-29.
2. Day.R.A and Underwood A.L , (1980) , *Quantitative Analysis* ,4th edition ,Prentice hall ,Inc, Engelwood Cliffs,NJ,USA . Terjemahan oleh Soendoro .R, Widyaningsih dan Rahadjeng, S , 197-208 .
3. Eurachem/ Citac Guide ,(2000) *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2 nd Ed.,52-58.
4. ISO guide to *The expression of Uncertainty of measurement*,International Organization for Standardization , Geneva Switzerland, (1993)
5. ISO Guide 30,(1992) *Term and definition used in connection with Reference materials*, Second edition,3.;6.
6. ISO Guide 35 ,(1989),*Certification of Reference Material, General and statistical principle*.
7. May W E and Gills T E (1999) , *Sertificat of analysis ,Standard reference material 3128 Lead* , National Institute of standard & Tecknology, 1.
8. May W E and Gills T E (1999) , *Sertificat of analysis ,Standard reference material 3133 mercury* , National Institute of standard & Tecknology, 1.
9. May W E , Trahey N.M (2001) , *Sertificat of analysis ,Standard reference material 3108 Cadmium Standard Solution* , National Institute of standard & Tecknology, 1.
10. May W E and Trahey N.M (2000) , *Serificat of analysis ,Standard reference material 3168a Zinc Standard Solution* , National Institute of standard & Tecknology, 1.
11. Meites L (1962) , *Handbook of analytical chemistry*, Mc Graw-Hill Book Company , First Edition , New York, 3-185,172,179
12. Mettler Toledo, *Titration Application brochure 16, validation of titration method a guideline for customer of Mettler*, Toledo titrator, 5-9.
13. Nuryatini, Sumardi dan Eli Susilawati (2003) , *Sertifikasi bahan acuan timbal dan estimasi Ketidakpastian Pengukurannya*, Prosiding Pertemuan Dan Presentasi Ilmiah Standardisasi dan Jaminan Mutu , Jakarta, 29-34.
14. Pan X.R., (1997), *Hierarchy of Refference materials certified for chemical composition*, Metrologia,34,1997,37-38.
15. Wilson C.L and Wilson D L(1960) , *Comprehensive Analytical Chemistry* , Elsevier Publishing Company , Amesterdam,337,349 .

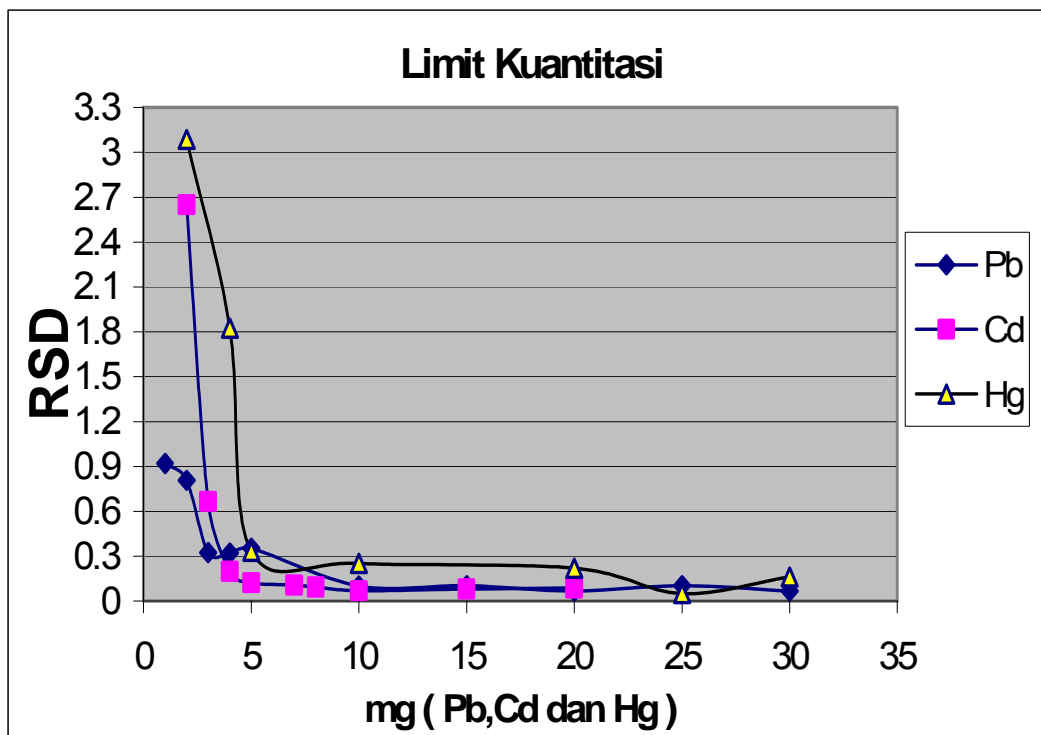
LAMPIRAN

Tabel 1 : Hasil pengujian % Recovery titrasi kompleksometri ion Cd,Pb dan Hg

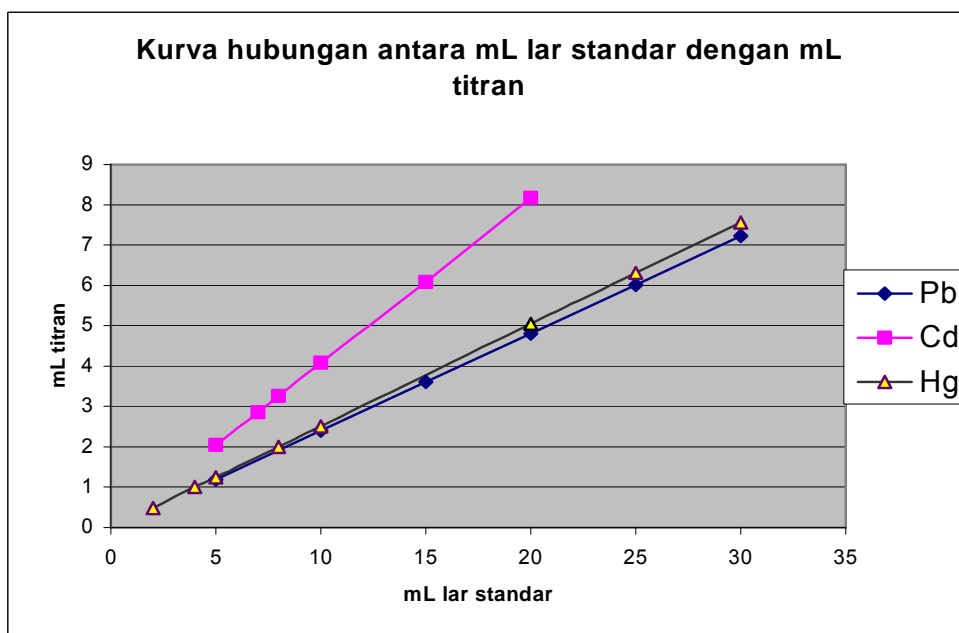
No	Recovery (%)		
	Cd	Pb	Hg
1	99,18	99,32	99,72
2	99,47	99,55	99,74
3	99,69	99,75	99,40
4	99,49	99,61	99,47
5		99,56	99,39
6		99,45	99,60
7		99,66	
8		99,54	
Rata-rata	99,46 ± 0,21%	99,56 ± 0,13	99,55 ± 0,16

Tabel 2 : Data penentuan repetabilitas titrasi kompleksometri penentuan Cd,Pb dan Hg .

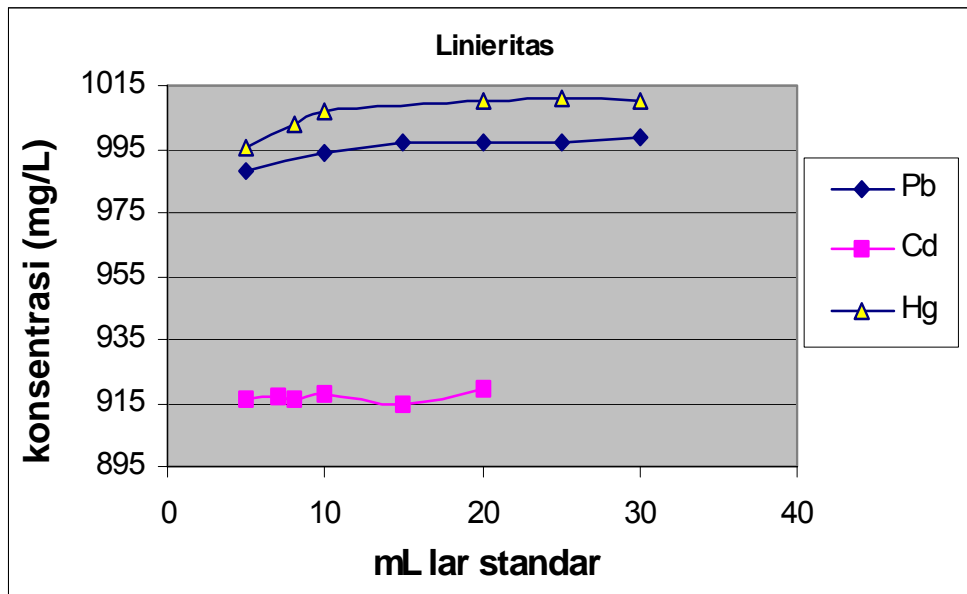
No	Volume EDTA (mL)		
	Cd	Pb	Hg
1	8,8431	7,2158	7,5000
2	8,8449	7,1888	7,4827
3	8,8392	7,2027	7,4997
4	8,8441	7,2097	7,4661
5	8,8462	7,1947	7,5000
6	8,8358	7,2009	7,5000
7	8,8483	7,2095	7,5001
8	8,8402	7,2041	
Rata – rata	8,8427±0,00408	7,2032±0,00886	7,4943±0,01382



Gambar 1 : Kurva hubungan antara mg Cu, Cd dan Hg dgn RSD



Gambar 2 : Kurva hubungan antara mL ion logam dengan mL titran



Gambar 3 : Kurva hubungan antara mL contoh dengan konsentrasi contoh

Comparison Of Equine Influenza Virus Purification By Ion Exchange Chromatography And Polyethylene Glycol Precipitation

Sri Widarti

Politeknik Negeri Bandung (POLBAN)

Abstract

Isoelectric points (pIs) of equine influenza A viral proteins were determined, found to be 4.2, 4.3 and 4.4. An anion exchange chromatography (Q Sepharose FF, 1 mL) was selected to purify the ultrafiltered concentrated virus at pH 7 since hemagglutinin (HA) did not show any activity at pH 5 and lower pHs. Percentage HA recovery of the purified virus eluted by 1 M NaCl was 29.21%, while DNA was also bound to and eluted from the matrix.

In another experiment, polyethylene glycol (PEG) consisting of MWs 4, 6 and 8 kDa were examined for virus precipitation from clarified virus culture broth. Precipitation with PEG (MW 4 kDa, 37.5% w/v) showed highest HA recovery (72%) activity. DNA could be precipitated by PEG (8 kDa) at a concentration of 25% (w/v) without precipitating virus. PEG precipitation was found better than anion exchange chromatography with respect to HA recovery.

1. Introduction

Influenza virus causes influenza disease. At present there are three types of influenza virus. It is named influenza A, B and C virus. Influenza virus is a significant pathogen for human and animals. Regular epidemics of influenza A and B viruses occur continuously, causing illness and death, while influenza C virus causes non-epidemic childhood disease.¹

Pandemics caused by influenza A viruses appear to have occurred for centuries at irregular intervals of one to several decades. The Spanish flu pandemic occurred in 1918-1919, caused more than 20 million people death worldwide. In 1957-1958 Asian flu attacked, around 70,000 people death in USA. Hongkong flu, in 1968-1969, occurred resulting in the deaths of an estimated 30,000 people.¹

Two main efforts of antiviral defense are prevention of viral infections by treatment of viral disease with drugs and vaccines.

One of immune responses to viral infection is adaptive defense that has memory of specific viral identity. The adaptive defense consist antibody that is produced by B cell. Vaccine is inactivated virus and virion subunits that

induced an antibody response. Vaccine works primarily make use of the ability of immune system to remember the identity of a specific virus after the initial encounter. When virus infect cell later, immune system can produce appropriate antibody immediately.¹

Some of antiviral drugs that used in influenza disease are:

1. Ribavirin has broad spectrum antiviral activity against many DNA and RNA viruses. However it is relatively toxic and its development and indications for use have been controversial.
2. Amantadine, specifically inhibits influenza A virus. Disadvantages of these drugs are influenza A virus mutants resistant to amantadine arise after therapy and the side effect are common, particularly those affecting the central nervous system.¹

Because influenza A virus is important human and animal pathogens and limited antiviral drugs, side effect of antiviral drugs, possible virus resistance to the drugs and are expensive, the production and purification of virus vaccine

has become one important issue. High quality of influenza vaccines can be obtained only by efficient production and purification.²

In many cases, the regulation on the manufacture of healthcare and food products makes the separation and purification as a crucial and challenging component of commercial biotechnology. The ratio of fermentation to product recovery costs is about 60:40 for many older antibiotics such as tetracycline. For recombinant DNA fermentation products such as gamma interferon, the cost of downstream purification is very important and can amount to 80-90% of the total manufacturing cost. The commercial success in biotechnology products is highly dependent on the successful development and application reliable and sensitive bio-separation methods.³

Influenza viruses were produced by their replication within MDCK cell cultivated.⁴ These viruses will bud from the cell. To achieve influenza virus that obey the regulation for vaccine purity, influenza viruses should purify from cell debris such as protein and DNA.

Influenza viruses have hemagglutinin and neuraminidase glycoprotein which are amphoteric on their envelope. The charge of the protein depends on the pH. At certain pH, the protein does not carry any charge and is known as isoelectric point (pI) that can be determined by isoelectric focusing method. When pH greater than pI, the charge of protein is negative and pH less than pI the charge of protein is positive. Based on this properties virus will capture to an anion exchange matrices when pH greater than its pI and capture to kation exchange matrices when the pH less than its pI.

Precipitating of influenza virus is a means of concentrating and pre-purification in downstream processing. Some precipitating agent such as polyethylene glycol (PEG) is used. Variation of PEG concentration and molecular weight can be carried out to determine optimal condition of influenza virus precipitation.

Present method of influenza virus purification is multi step. Virus broth culture is purified by sequences of purification: depth filtration, ultra filtration and gel filtration. Recovery of this

multi step is less, around 60%.⁵ Alternative methods are needed to increase influenza A virus recovery from culture broth. The aim of the research is to develop a strategy to capture and elute gel filtered purified equine influenza virus on an ion exchange column compare with precipitation method using polyethylene glycol.

2. Experimental

2.1. Material

Clarified virus culture broth was used in precipitation method and ultrafiltered concentrated virus in an ion exchange method (Max Planck Institute, Magdeburg, Germany). Polyacrylamide gel (Mini clean gel IEF ultra, Sinus, Germany) and sinulyte solution (Sinus, Heidelberg, Germany) were used to determine Isoelectric points (pIs) of equine influenza A viral proteins. Polyethylene glycol (PEG) consisting of MWs 8 kDa (Sigma, Germany), 6 and 4 kDa (AppliChem, Darmstadt, Germany) were used as received. DNA concentration was assayed using pico green dsDNA quantification methods (Pico Green ds DNA Quantification Kit, Molecular Probes, The Netherlands).

2.2. Isoelectric focusing^{6,7}

Polyacrylamide gel is used to run isoelectric focusing. The gel was soaked in sinulyte solution. Gel was run at 700 v, 6 mA and 4 w for 20 minutes. Equal amount of culture broth was diluted with sample diluter with ratio 50:50 and sonicated by sonicator for 30 secs, 3 times. 15µL of pI marker proteins (10 mg/mL) was mixed with sample diluter (50:50) and 25 µL of virus culture were loaded to sample applicators. The gel was run at 500 V, 4 mA, 4 w for 20 minutes, followed by running the gel at 2000 V, 7 mA, 9 w for 90 minutes and at 2500 V, 7mA, 9 w for 15 minutes.

The focused gel was stained by silver staining. The distances traveled by the proteins and the pI markers were measured. The pI of the viral protein was calculated from the correlation between the pI and distance traveled by the pI markers.

2.3. Dialysis

Dialysis of culture broth was carried out at pH 4, 4.5 and 5 over night at 4°C using 20 mM Glycine-HCl buffer. Hemagglutinin (HA) activities of the dialyzed sample were measured by the method described by S.J. Flint et al.⁸

2.4. Ion Exchange Chromatography (IEC)^{9,10}

Anion exchange chromatography using 1 mL Sepharose FF column was carried out. The column was equilibrated with 10 mL start buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7) at flow rate 1 mL/min. Nine ml of the ultrafiltered sample was loaded to the column at flow rate 0.5 ml/min. Six fractions (1.5 mL each) were collected. The column was washed with start buffer solution, 20 fractions were collected. Column were eluted with 1 M NaCl at flow rate 0.5 mL/min, 11 fractions were collected. HA, protein and DNA of all fractions were assayed.

2.5. Precipitation¹¹

Polyethylene glycol (PEG) consisting of MWs 8, 6 and 4 kDa were mixed with clarified culture broth till total volume was 40 mL and the final concentration of PEGs varied 12.5, 25 and 37.5% (w/v). The resulted solutions were centrifuged at 2500 g, 4°C for 30 min. HA, protein and DNA of supernatants and precipitates were assayed.

2.6. HA, DNA and protein assay

2.6.1. HA assay

Hemagglutinin (HA) was assayed by method described by S.J. Flint et al.⁸ The HA activity was expressed by logarithm value of the sample dilution.

2.6.2. DNA assay

DNA concentration was assayed using pico green dsDNA quantification methods. The DNA quantification method was calibrated whether 2 to $1.95 \cdot 10^{-3}$ µg/mL in the higher range and 0.04 to $4.10 \cdot 10^{-5}$ µg/mL in the lower range. The DNA concentrations of the sample were calculated from standard calibration curve.

2.6.3. Protein assay

Protein concentrations were determined by Bradford standard assay¹² using microplates. A standard curve was plotted using 0.008 to 0.04 (mg/mL) in the super lower range, 0.03 to 0.1 (mg/mL) and in the lower range and 0.2 to 1.0 (mg/mL) in the higher range. Protein concentrations of samples were calculated from standard calibration curve.

3. Result and discussion

3.1. Isoelectric Focusing of Viral Proteins

Silver stained migrated viral proteins and pI markers in a gel are shown in Figure 1.

The marker proteins on the gel showed several bands according to their pIs (Figure 1a). Marker proteins at the left hand side and proteins in the virus sample on the same gel, at the right hand side on the top are shown in Figure 1b. The magnified view of the viral proteins in the sample showed three distinctly visible bands which were closed to each other (Figure 1c).

A linear relationship between pI of the marker proteins versus the distance traveled by these proteins on the gel was drawn and shown in Figure 2. The distance traveled by three proteins in the virus sample were 6.4, 6.5 and 6.8 cm. Based on the following equation (from the calibration curve, Figure 2),

$$pI = -0.9481 X + 10.629 \quad X = \text{distance traveled by the band}$$

pIs of proteins are 4.25, 4.36 and 4.46, respectively.

The abnormality of the pI marker bands are due to physical damage of the gel. Therefore, the closer view of the pI marker proteins are shown separately. From the pI values of the viral proteins, it is concluded that these proteins are acidic. Above the values of these pIs, these proteins are negatively charged whereas below that they are positively charged.

To decide to use type of ion-exchanger, the antigenic activities (HA) of the dialyzed virus at pH 4.0, 4.5 and 5.0 were evaluated. HA activities were lost at these pHs. Since at pH 7.0 the HA activity was found and around this pH HA activity is measured routinely using PBS buffer, anion exchanger at pH 7 was chosen as the chromatographic method for capture of the virus.

3. 2. Anion Exchange Chromatography

HA activities, protein and DNA concentration profiles of loading, washing and elution fractions on the anion exchange column are shown in Figure 3.

Material balances of HA, protein and DNA are summarized in Table 1. The percentage of HA, protein and DNA unadsorbed are 8.6, 53.3 and 19.2%, respectively whereas the percentage of HA, protein and DNA from the bed during washing are 1.8, 12.4 and 7.8 %, respectively. Twenty nine percent of HA, 19.8% of protein and 15.8% of DNA were recovered in the eluted samples whereas 81.4% of protein and

85.3% of DNA were removed from the eluted samples. Capacity of the column for influenza A virus is 4.06 log/0.1 mL HA units which corresponds to 8.16 mL of ultrafiltered culture broth.

Lower recovery of HA (29.2%), DNA (15.8%) and protein (19.8%) indicates binding of HA, DNA and proteins to the column is strong, which could not be eluted efficiently by the use of current elution buffer (1M NaCl). A negligible amount of HA in the wash may be attributed to the virus coming out of the void space of the ion exchanger. Higher protein unadsorbed to the column compared to the adsorbed one attributes the contaminating proteins.

The reasons for the low recovery of HA (29%), protein (19.2%) and DNA (15.8%) are not clearly understood. The most probable reason is the tight binding of all components to the matrix, which could not be eluted from the column at lower concentration of NaCl. A better design of elution by higher concentration of NaCl could improve recovery. Higher reduction of contaminating proteins and DNA establishes greater degree of purity of the virus.

3.3. PEG Precipitation

Percentages of HA, protein and DNA concentration in the supernatant in varying PEG concentrations and MWs are shown in Figure 4. Proteins and virus particles were not precipitated in 12.5 and 25% (w/v) PEGs consisting of MWs 4, 6 and 8 kDa (Figure 4a and 4c). DNAs were not precipitated in 12.5% (w/v) PEGs of MWs 4 and 6 kDa, but precipitated in 25% (w/v) PEG 8 kDa (Figure 4b).

Percentages of HA, protein and DNA in the precipitate is shown in Figure 5. Percentage of HA recovered by 37.5% (w/v) PEG precipitation of MW 4, 6 and 8 kDa are 72, 69 and 43%, respectively. Percentage of protein precipitated are 6.4, 13.3 and 47.3%, respectively. The value for DNA precipitation are 95, 91 and 91% using above-mentioned PEGs.

Polar-polar interaction of the virus particles with PEG caused virus precipitation which is detected by HA activity. The greater percentage of DNA precipitation than virus and protein may be explained on the basis of higher polar-polar interaction of DNA with PEGs compared

to virus and contaminating proteins. Higher percentage of virus precipitation indicates that the surface of glycoproteins is more polar than that of the contaminating proteins.

An Increase in chain length of PEG which is due to higher MWs decreases precipitation. This phenomenon can be explained on the basis of fitting of certain chain length of PEG into the cavity of glycoprotein surface. Differing PEG MWs did not affect DNA precipitation which is not clearly understood. Precipitation of DNA with 25% (w/v) PEG (8 kDa) allows the separation of DNA from the virus in the first step and subsequent virus can be precipitated by 37.5% (w/v) PEG (4 kDa) with less contaminating DNA.

4. Conclusion

The viral proteins separated by isoelectric focusing were found acidic, which suggests the use of anion exchange chromatography for capture and elution of the influenza virus. Anion exchange chromatography could adsorb the virus efficiently, but the elution was not very effective. This method could not separate DNA from the virus sample.

On the other hand precipitation with PEG of MWs 4 kDa and concentration 37.5% (w/v) achieved the highest HA recovery. The precipitation method could remove most of the contaminating proteins. DNA could be precipitated by 25% (w/v) PEG of 8 kDa and subsequently virus with 37.5% (w/v) PEG of 4 kDa. This method is very useful for virus concentration, DNA and protein removal. HA recovery by precipitation method is higher than anion exchange method of purification.

References

1. Basler, F, Christopher and Palese, Peter (2000), Encyclopedia of Microbiology Volume 2, 2nd edition, 797-804.
2. Nayak, D (2002), Downstream processing of influenza virus, Max Plank Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg. <http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/research/project/>
3. Blanch, Harvey.W and Clark, Douglas.S (1996), Biochemical engineering, Marcel Dekker Inc, New York, USA.
4. Genzel, Y and Sann, H (2000), Influenza vaccine production in microcarrier systems, Max Plank Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg. <http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/research/project/>

Sri Widarti

5. Nayak, D.P., Lehmann, S., Reichl, U., Use of expanded bed chromatography for downstream processing of equine influenza virus, Max Plank Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg. <http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/research/project/>
6. Westermeie, Reiner (1997), Electrophoresis in Practice, 2nd ed, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Germany.
7. Isoelectric Focusing in the presence of urea with clean gel IEF ultra, ETC electrophorese-Technik
8. Flint.J.S., et al (2000), Principles of virology, ASM press, American Society for Microbiology, Washington.
9. Handbook from Amersham Biosciences, Ion exchange chromatography: Principle and Methods.
10. HiTrap IEX Selection Kit, Amersham Biosciences, Sweden.
11. Rosenberg, Ian.M, (1996), Protein analysis and purification, Braun-Brumfield, Boston, USA
12. Turkova, Jaroslava (1993), Bioaffinity chromatography, 2nd ed, Elsevier Science Publisher B.V, Netherlands.

LAMPIRAN

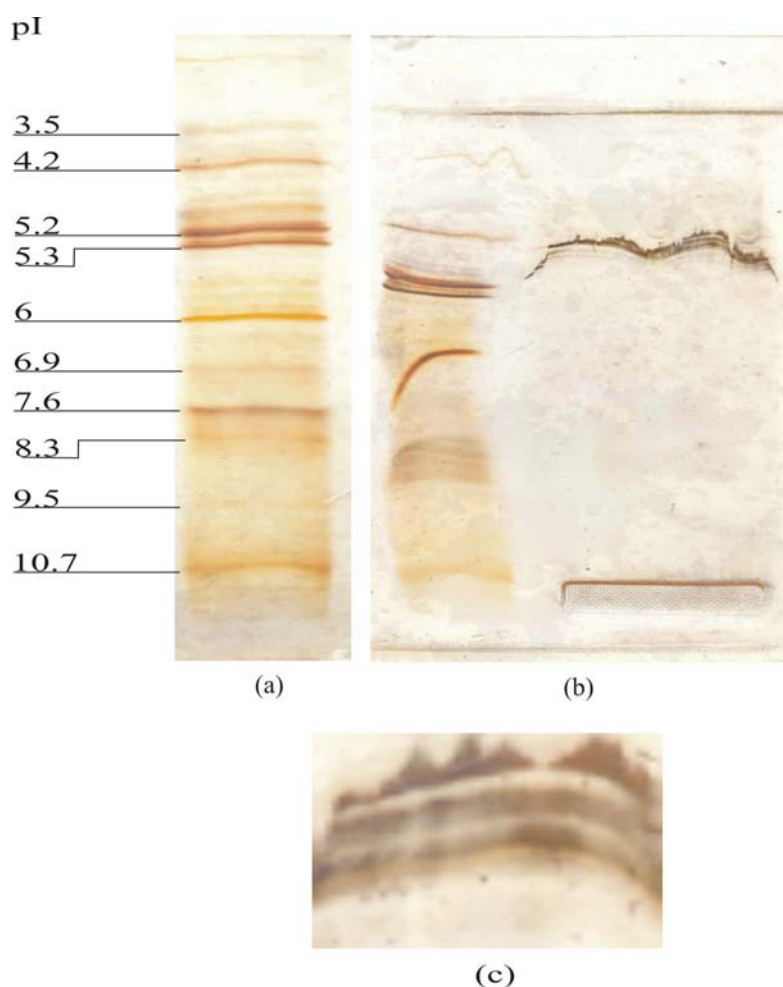


Figure 1. Silver stained isoelectric focusing gel. Clear view of the marker proteins pI marker proteins and viral proteins (b) Closed view viral proteins (c)

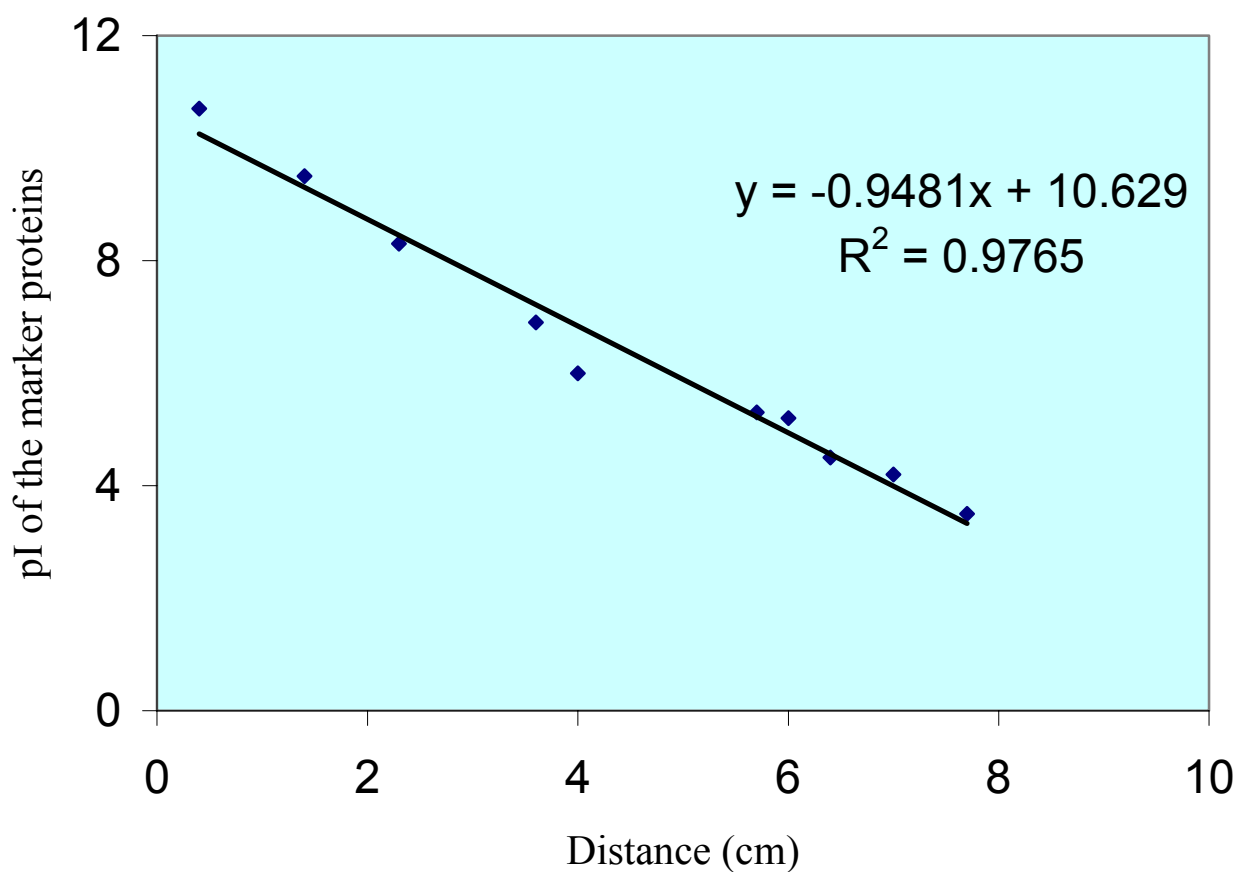


Figure 2. The calibration curve of the pI marker proteins

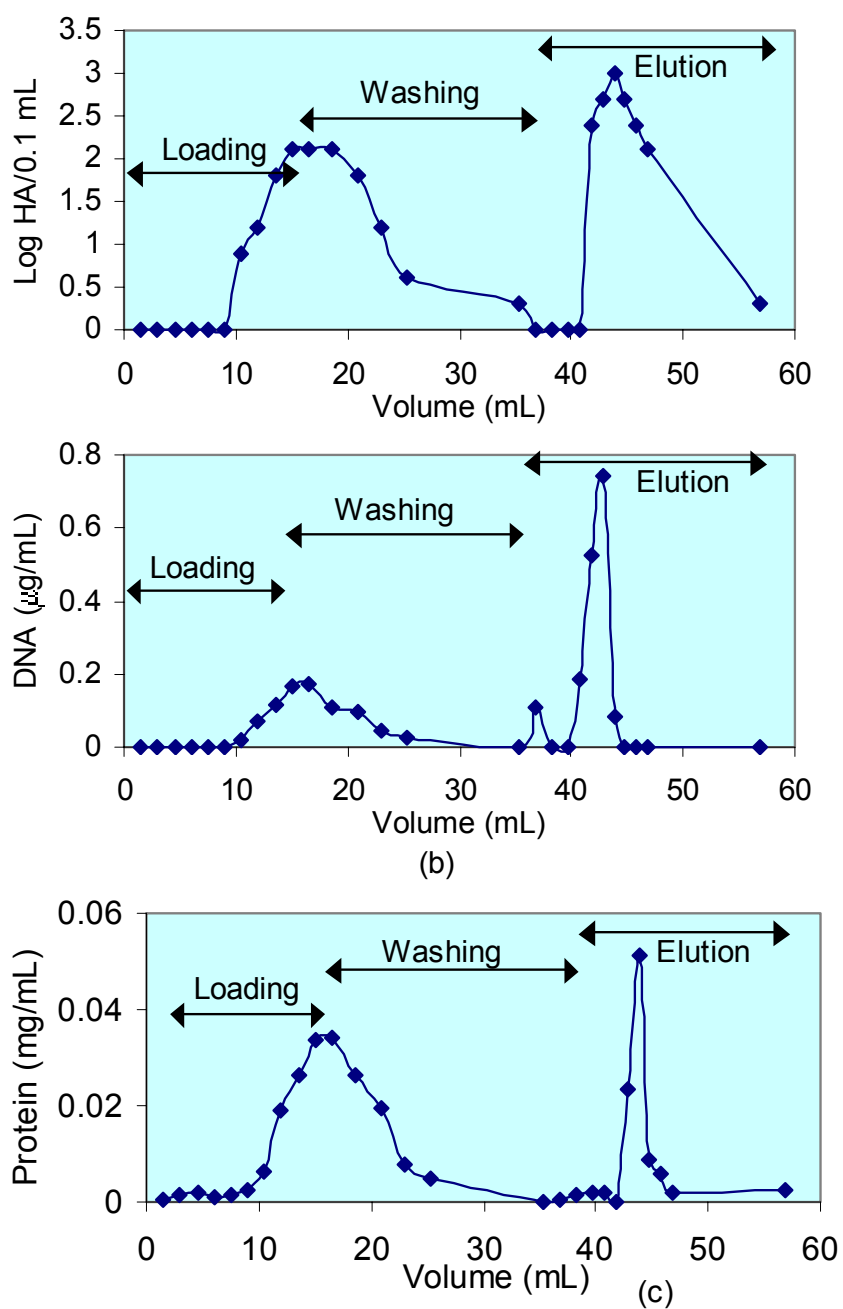


Figure 3. Adsorption, washing and elution profiles of HA (a), DNA (b) and protein (c) on Q Sepharose FF

Table 1. Material balance of an anion exchange (Q Sepharose FF, column volume was 1 mL and operated flow rate 0.25 mL/min)

Parameters	HA	Protein	DNA
% unadsorbed	8.6	53.3	19.2
% washed	1.8	12.4	7.8
% Recovery in eluted	29.2	19.8	15.8
% reduction	-	81.4	85.3

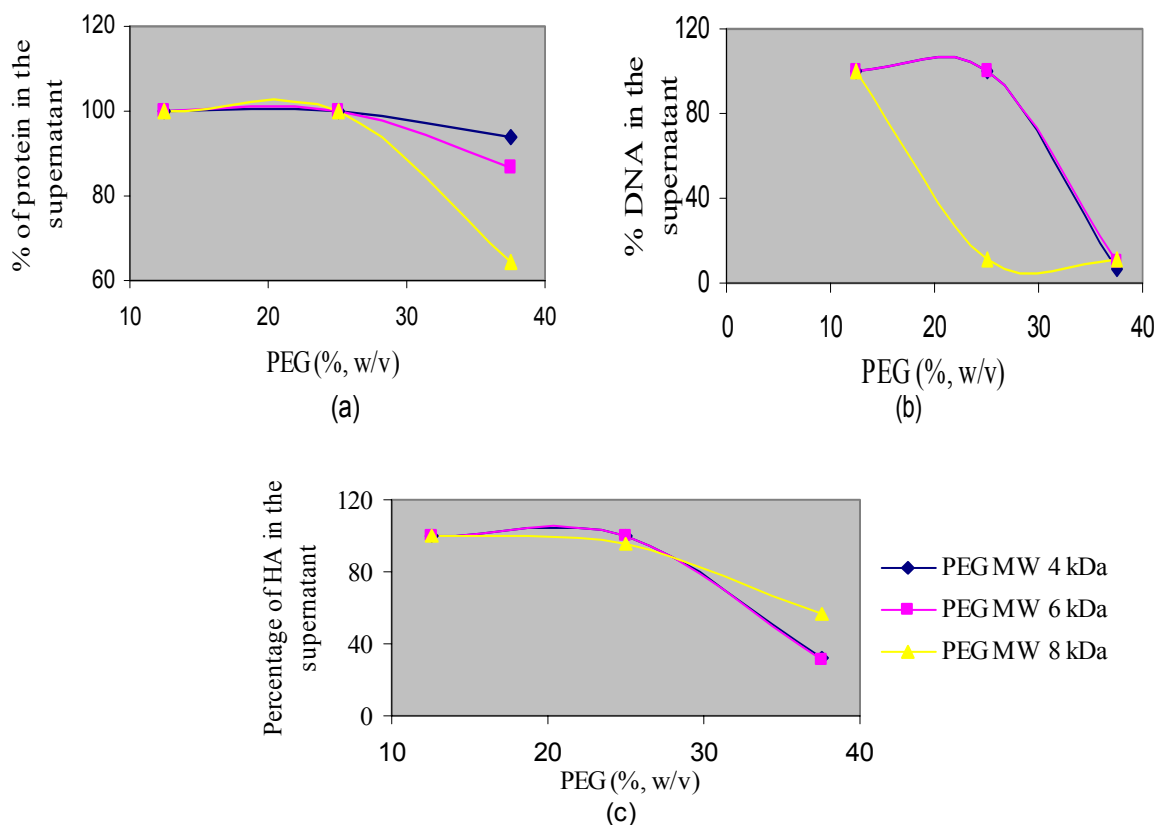


Figure 4. Percentages of protein (a) DNA (b) and HA (c) in supernatant versus PEG concentrations

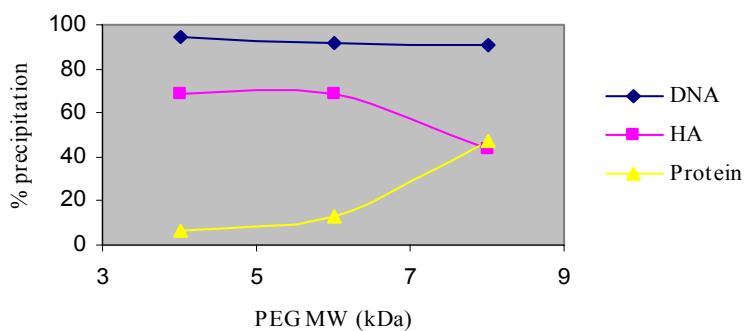


Figure 5 Protein, DNA and HA precipitation by PEGs (37.5%, w/v)



Organic Synthesis Chemistry: The Problematical of Complex Target Molecules

Umar A. Jenie

Indonesian Institute of Sciences

Definition

Conforth (1994) gives definition for organic synthesis as a **well-plan construction of organic molecules, using a series of chemical reaction**. Chemists already used that definition for more than 250 years; therefore, this definition is not only older than the idea of chemical structure, but it is also older than the Dalton's Atomic Theory, in which chemical sciences generally are based on. The word 'synthesis' is derived from Greek, which means **to put together**. Indeed, such terminology is not appropriate for explanation of synthesis activities which we know today. Even if we want to use forcefully such a meaning, it is only appropriate for addition reaction, such as diene synthesis or catalytic hydrogenation. In reality, only few words does not have a change in their meaning in the course of their history, and the word synthesis is not an exception. The word 'construction' seems to be more appropriate for illustrating synthesis activities as it is known today, since the synthesis is always involving a breaking the old bonds and making the new ones. Based on the word 'construction', Conforth gives such a definition for organic synthesis.

Streitwieser and Heathcock (1976) defines organic synthesis as **the art to make organic compounds through a well-plan and reasonable series of reaction, using simpler starting materials**. By such a definition, Streitwieser wanted to express that organic synthesis is actually an 'art'. In the Nobel Conferring Ceremony to Robert Burns Woodward (known as *the greatest synthesis chemist*), the Sweddish Nobel Council praised him with very significant words '*for his meritorious contribution in the art of organic*

synthesis' (Ollis, 1980). Once again, this statement was an explanation, that synthesis organic is a kind of art. The question is, what kind of art the synthesis activities look like? Conforth (1994) (also a Nobel Laureate in Chemistry, 1975), gave the answer as follows.

The art of synthesis is very close to or looks like **the art of architecture or chess game**. Constructive imagination of an architech is always facing with material or labor constraints; likewise, constructive imagination of synthetic chemists is always facing with chemical constraints, - whether they are starting materials, intermediates, catalyst, or solvent-, and availability of chemical reactions which are capable for construction of desired organic molecules. In the building construction, an architech has to prepare with designing a blue print, which is a two dimensional illustration of the desired building. Then, it is followed by making a three dimensional model, in order to know the desired spacial structure of that building. Similarly, a synthetic chemists has to prepare a synthetic planning which consists of designing general chemical reaction, and considering the stereochemical of the target molecule. This assessment has to be done first, in order that we could choose the right chemicals, catalyst, and of course the reactions which could lead to the target molecule. Then, if necessary, this strategy also include assessment of stereoselective and regioselective reactions, so that the architecture of the target molecule could be achieved.

The art of synthesis is also similar to that of the chess game (Conforth, 1994). A masterpiece of a grandmaster always emerges, when he/she faces with a very tough and hard enemy.

He/she has to be able to develop his/her creative thinking in moving of the chessman; in order that he/she could win the game, and not be trapped by this tough enemy. If he/she could not develop his/her creative thinking, he/she would be *schaackmat* by the enemy; and then all steps of the game were useless. Similarly, creativity of synthetic organic chemists emerges when he/she is facing with strong and tough 'enemy', *i.e.*, complexity of a target molecule. He/she must be able to create chemical reaction steps in order to construct the complex target molecule in a proper manner. One error in choosing a right chemical step within a series of reactions would be devastating to all reaction steps already done, and in turn the target molecule could not be achieved.

Structural Complexity of Target Molecules and Their Synthesis Design: Problem on the Synthesis of Chlorophyll-a and Vitamin B-12.

What is the complexity of a target molecule? From chemical synthesis point of view, the factors which conspire to make a synthesis difficult to plan and to execute, are those which give rise to structural complexity. In the organic synthesis term, *molecular size, element and functional group content, cyclic connectivity, stereocenter content, chemical reactivity, and structural instability* all contribute to molecular complexity in the synthetic sense (Corey and Cheng, 1989). The important in and usefulness of studying the complex molecule synthesis are given by Corey and Cheng (1989), when they stated that "*molecular complexity can be used as an indicator of the frontiers of synthesis, since it often causes failures which expose gaps in existing methodology. The realization of such limitations can stimulate the discovery of new chemistry and new ways of thinking about synthesis*".

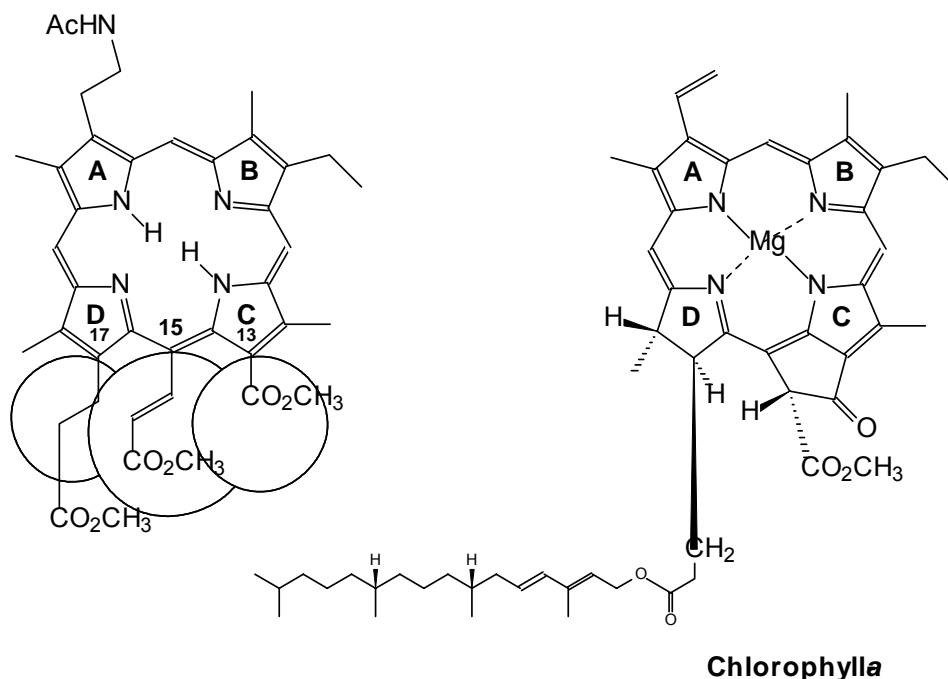
The successful synthesis of a complex molecule depends upon *the analysis of problem to develop a feasible scheme of synthesis*. This synthesis scheme illustrates a pathway from *starting material/s*, through *intermediates*, to a *target molecule*, all of which are connected by feasible chemical reactions for required conversions. Such analysis to get a feasible scheme of synthesis is known as *synthesis design* which become the 'hearth' of all

synthesis efforts (Corey and Cheng, 1989). The *Maestro* of organic synthesis, Prof. Dr. RB. Woodward (1956) was expressing the important of developing synthesis design strategy, when he said: "*Synthetic objectives are seldom, if ever, taken by chance, nor will the most painstaking or inspired, purely observational activities suffice. Synthesis must always be carried out by plan, and the synthetic frontier can be defined only by terms of the degree to which realistic planning is possible, utilizing all of the intellectual and physical tools available*".

How could a synthesis scheme which illustrate a pathway of chemical reaction, be set up or be made, especially for a complex target molecule? In other words, how to set up a synthesis design for a complex target molecule? The answer depends on the chemists and the problem. It has also change over time. Thought must begin with *perception*, - the process of extracting information which aids in *logical analysis of the problem*. Cycles of perception and logical analysis applied reiteratively to a target (molecule) structure and to the 'data field' of chemistry, lead to *the development of concepts and ideas for solving a synthesis problem* (Corey and Cheng, 1989). Moreover, Corey stated that 'as the reiterative process is continued, questions are raised and answered; and propositions are formed and evaluated with result that ever more penetrating insights and more helpful perspective on the problem emerge'. The ideas which are generated can vary from very general 'working notions on the problem hypotheses' to quite sharp and specific concepts.

Strategy used by Woodward (1960) for synthesizing the chlorophyll-*a* was a good example of synthesis design based on development of perception and logical analysis of the target molecule. A porphyrin derivative with methyl acrylate side chain at C-15 and methoxycarbonyl at C-13, was used as antermediate in the total synthesis of chlorophyll-*a*. (Scheme-1).

Substituents interactions at C-13, C-15, and C-17 which happen within the intermediate molecule gives rise to a sterical strain, since a rigid structure of *sp*²-hybridized porphyrin ring system has no spaciousness 'room' for these bulky substituents. Consequently the geometric structure of pyrrolic *C* and *D* moieties will be



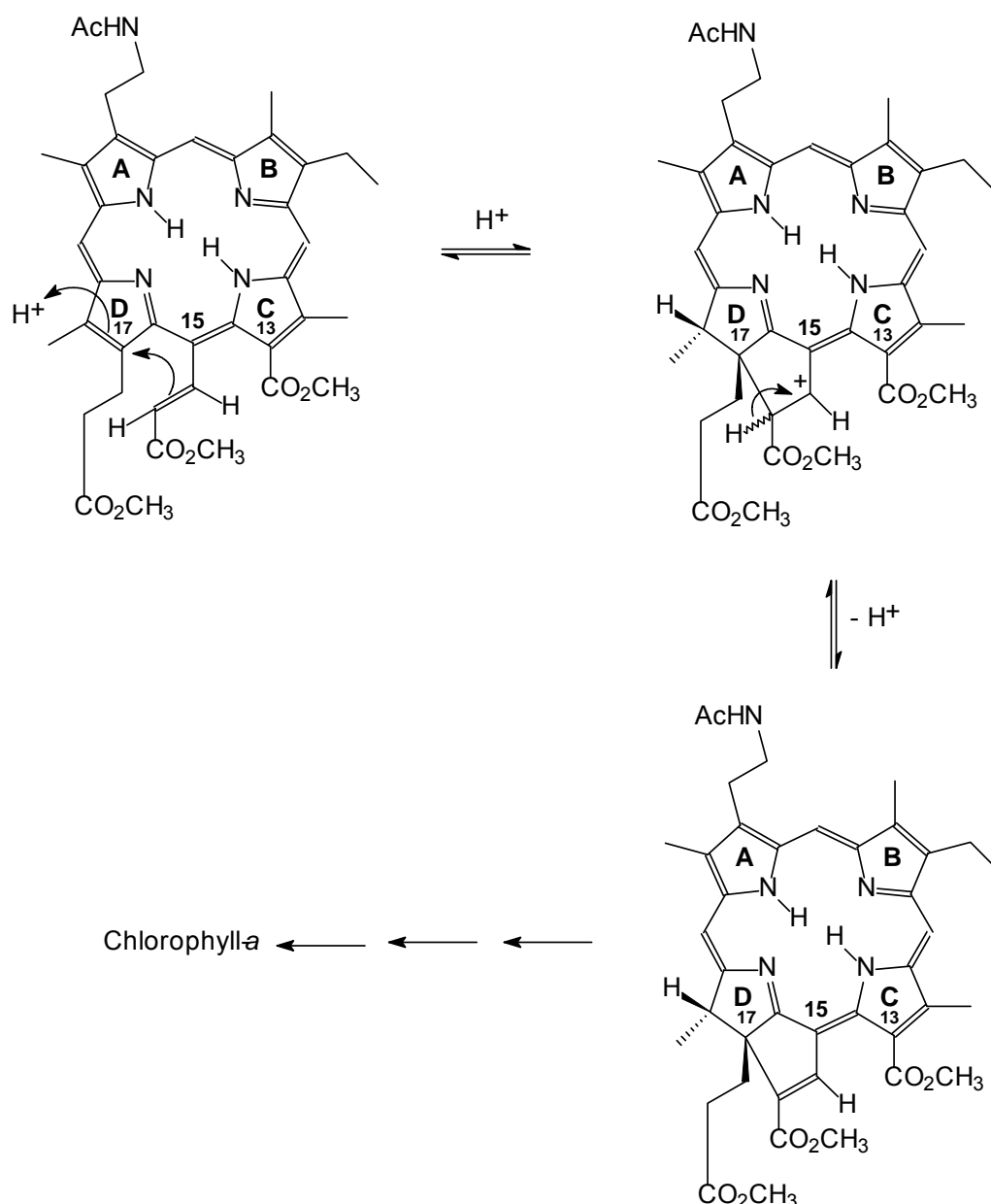
Scheme-1 Chlorophylla and its starting material of porphyrin-methyl acrylate derivative. It was shown that substituents on C-13, C-15, and C-17 are crowded.

folding out of porphyrinic plane. This nature of the intermediate structure which gives rise to a sterical strain, was manipulated by Woodward to solve the main constraint of the synthesis process of the chlorophyll-*a*, *i.e.*, by applying regioselective hydrogenation of the pyrrolic ring *D* at C-17/C-18. In Woodward perception, this sterical strain could be deleted, if the sp^2 -hybridized system of C-17/C-18 is converted into the sp^3 one, which will increase the 'room' spaciousness. In other words, the sp^3 -hybridized system is thermodynamically more stable than the sp^2 one; therefore, selective hydrogenation at position C-17/C-18 will be favoured by this sterical strain effect which is due to substituents interactions at C-15, C-13, and C-17 (Scheme-1). With this conversion from sp^2 -hybridized system into the sp^3 one, those substituents at C-13, C-15, and C-17 will be positioning at above and below of the porphyrinic plane, and therefore the geometric structure of the porphyrin ring system backs to flat (*planar*) again. Such a geometric structure is indeed possessed by the chlorophyll-*a*, and Woodward has found its synthesis design based on this facts (Fuhrhop and Penzlin, 1984). Acid catalyzed intramolecular reaction between olefinic double bond of the acrylate side chain

with the pyrrolic *D* resulted in the formation of a dihydro derivative of the pyrrolic *D* ring system (Scheme-2).

The success in the construction of the dihydroporphyrin intermediate has paved the way to formation of the chlorophyll-*a*. Perception which was set up by Woodward to make the dihydro-intermediate, *i.e.*, *stereochemical strain release*-, was the key for the success of the chlorophyll-*a* total synthesis. He did a total synthesis of the chlorophyll-*a* using 55 reaction steps, helped by 17 research assistants, and needed 4 years to complete his synthesis. He was awarded a Nobel Prize in Chemistry at 1965.

At certain step within the synthesis process, chemists frequently faces constraint, that chemical reaction does not work properly. In that case, a smart innovation is indeed needed to overcome the problem. A total synthesis of Vitamine B-12 by Woodward and Eschenmoser (Eschenmoser 1974 *op cit* Fuhrhop and Penzlin, 1984), is a good example on how to overcome such constraint; and how does Woodward overcome it by developing a new theory on *Conservation of Orbital Symmetry*



Scheme-2 Intramolecular reaction between olefinic double bond of acrylate side chain with pyrrolic-D ring.

founded by him and his colleague, Rould Hoffmann.

Problem faced by Woodward and Eschenmoser was their failure to use sulfide coupling reaction or enamine to connect directly the ring A and D at C-1 (Scheme-3), in order to construct cobyric acid ring structure (a vitamine B-12 nuclei)(Fuhrhop and Penzlin, 1984). Such an unresolved-problem has forced the collaborative reasearch to get stuck for a long while.

During that time, Woodward and his colleague: Roald Hoffmann founded a rule concerning *conservation of orbital symmetry*. Later on, this new rule is known as a *Woodward Hoffmann Rule* (WHR). The WHR has been developed, and proven to be a useful rule for synthesis catalyzed by light. Thus, based on the WHR Eschenmoser has been able to directly connecting the ring-A and D using photochemical approach. He has irradiated an intermediate compound of tetracyclic-cadmium complex (Scheme-4).

This irradiation was successfully connecting the ring-A and D at C-1, and forming a right configuration of cobyric acid nuclei with 95% stereoselectivity (Ollis, 1980). The photosynthesis mechanisms proceeded within two step of reactions (Scheme-4). First, by influence of light, an *antarafacial* hydrogen shift from C-19 to C-1' was occurred (this reaction known as sigmatropic 18-electron rearrangement). Secondly, a *conrotatory thermally allowed cyclization* of the intermediate 16- π -electron mesoionic occurred (Eschenmoser, 1974; Pfaltz, 1977 *op cit.* Fuhrhop and Penzlin, 1984). The succeed of Eschenmoser has paved the way to continue the collaborative research between Woodward and Eschenmoser to synthesize the vitamine B-12. Finally, on February 12, 1972, the synthesis of vitamine B-12 has been completed. This collaborative research took 11 years, involving 99 research assitants from 19 countries.

Retrosynthesis Analysis and Stereospecific Reaction: The Case of Erythronolide-A Synthesis

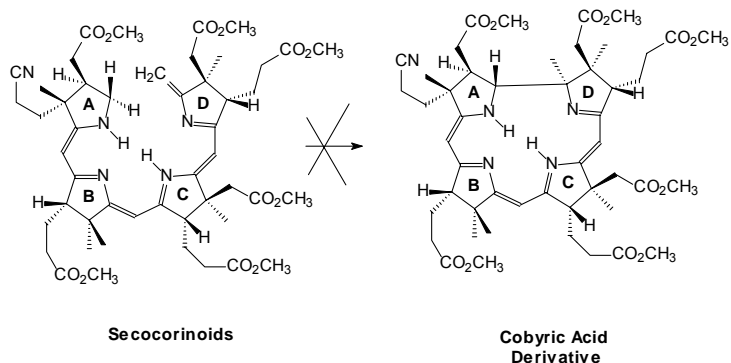
In the decade of 1970s, method for synthesis design was founded, developed, and standardized by Prof. Dr. James Elias Corey of the Harvard University. The method was known as **retrosynthesis analysis** or **antithesis analysis**. Basically, the retrosynthesis analysis is an analytical work on paper, *i.e.*, a paper chemistry. It is involving stepwise 'bond disconnections' within the target molecule until starting material/s is/are founded. This method was further developed by Dr. Stuart Warren of Cambridge University, and it is then known as **the disconnection approach**.

Based on retrosynthesis consideration, Corey has successfully synthesized more than 100 complex molecules of natural product. Among them are gibberellic acid, picrotoxins, erythronolide-A, and erythronolide-B. This retrosynthesis analysis method has made organic chemists easier in preparing the blueprint for their synthesis; and because of this method, synthesis of complex natural products has rapidly developed in the last two decades. His success in developing retrosynthesis analysis method, and its positive impact to the industrial world, Corey was awarded Nobel prize in chemistry in 1990.

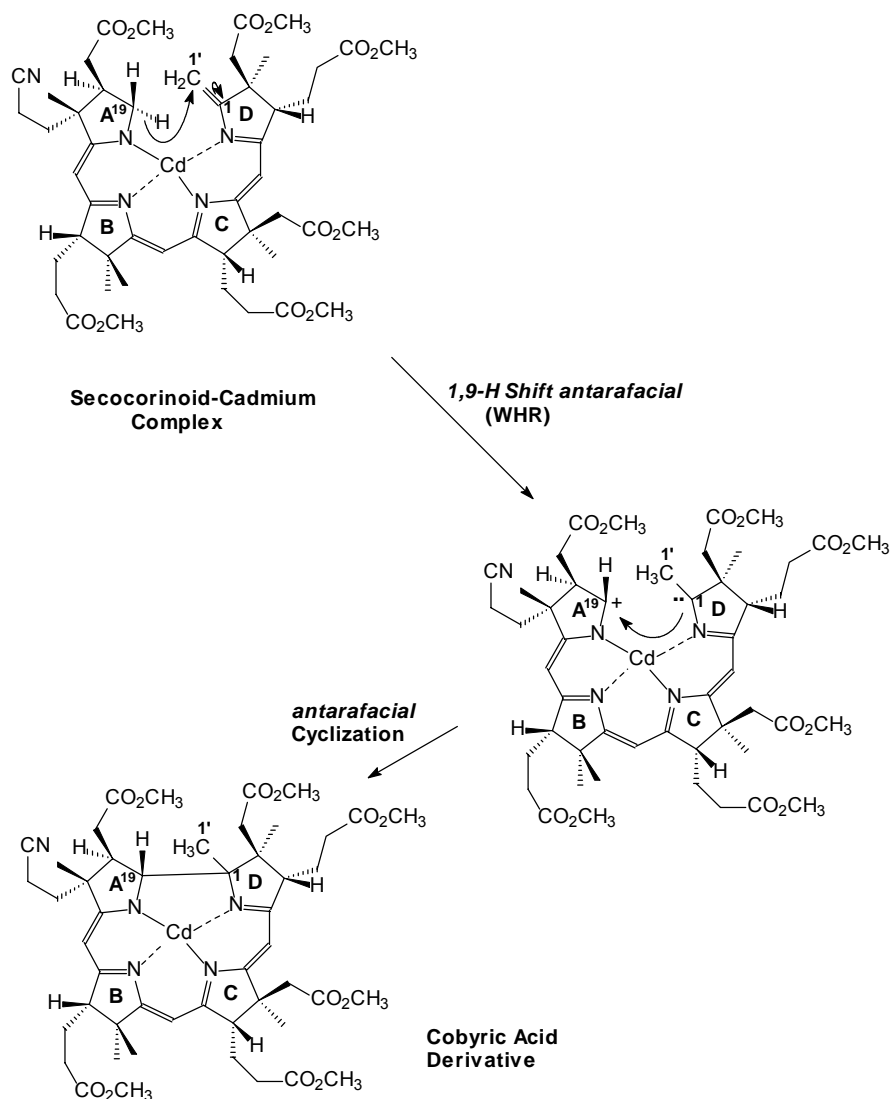
As stated before, the complexity of the target molecule frequently becomes a serious problem faced by most organic chemists. One of the molecule complexity is the present of **stereo centers** or **chiral centers** within the target molecule. A target molecule which consists of two chiral centers for example, will give $2^2 = 4$ mixture of isomeric products (March, 1985); the more chiral centers present within the target molecule, the more isomer products will be produced. Since only one isomer of target molecule is needed, separation of these isomers must be done. Again the more chiral centers present within the target products, the more isomers will be resulted, and in turn the more tedious separation and purification of so many isomeric mixtures must be carried out. Corey overcome this problem by developing a stereospecific synthesis reaction.

The synthesis of erythronolide-A (an aglycone part of erythromycin-A) carried out by Corey is a good example of the usage of stereospecific reaction for synthesis of target molecule having a lot of chiral centers. Erythronolide-A has **10 chiral centers**, with **absolute configuration of 2R,3S,4S,5R,6R,8R,10R,11R,12S,13R** (Scheme-5)(Corcoran, 1981; Nakagawa and Omura, 1984). If the synthesis of that compound was carried out without stereochemical consideration, it would give 1024 isomer products, ($2^{10} = 1024$). Out of 1024 isomers, only one isomer is desired, *i.e.*, the one that has an absolute configuration of 2R,3S,4S,5R,6R,8R,10R,11R,12S,13R. To isolate one of desired isomer out of 1024 ones, is a *mission impossible*. Therefore, Corey was carrying out a total synthesis of the erythronolide-A using stereospecific reaction approach.

Retrosynthesis analysis of erythronolide-A resulted starting materials of fragment-A and fragment-B (Corey *et al.*, 1978a; Corey *et al.*, 1978b, Corey *et al.*, 1979; Schomburg *et al.*, 1980)(Scheme-5). Corey used these fragments as starting materials for total stereospecific synthesis of the erythronolide-A. The fragment-A was an hepten-2-iodide derivative, potentially consisted of 10 carbon atoms, *i.e.*, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, and C-15 of the erythronolide-A ring to be constructed. The potentially carbon atoms of C-12 dan C-13 have already had desired absolute configuration. The fragment-B was hexano-



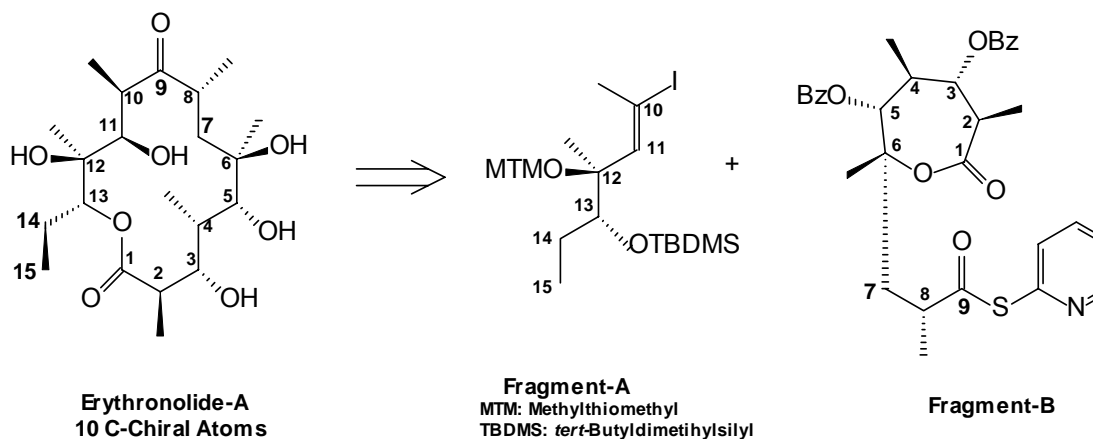
Scheme-3: Attempt to directly connecting between ring-A and D was unsuccessful



Scheme-4: Cyclization to form cobyrinic ring is possible, based on the Woodward-Hoffmann Rule (WHR)

lactone derivative with thioester chain, and potentially consisted of carbon atoms of C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, and C-9 of the erythronolide ring to be built. The potential carbon atom of C-2, C-3, C-5, and C-8 have

already been built at such, so that they have also had desired absolute configuration. Stereospecific reaction between the fragment-A and fragment-B was proceeding *via* Grignard modification, and then it was followed by 22



Scheme-5: Retrosynthesis Analysis of Erythronolide-A

further steps, to get an erythronolide-A with natural absolute configuration.

Concluding Remarks

Organic synthesis chemistry is basically a kind of chemical sciences as well as a chemical method for construction organic molecules, using simpler molecule/s as starting materials.

The aim of organic synthesis activities can be directed to construct totally new molecules, or to make natural molecules. Total synthesis of natural molecules having complex structure, such as the chlorophyll-*a* and vitamine B-12, could only be carried out just for academic or scientific purposes, *i.e.*, to confirm their chemical structures.

In molecular construction, the main problem of complexity of the target molecules, such as **molecular size** and **functional groups** can be overcome by accurate observation and calculation of physicochemical nature of the target molecules, especially their geometric structure, as already done by Woodward in the synthesis of chlorophyll-*a*. Whereas problems on **cyclic connectivity** and **the present of chiral centers** within the target molecules, can be overcome by using specific photo-reaction based on, for example the *Woodward Hoffmann Rule*, as done by Woodward and Eschenmoser in the synthesis of vitamine B-12; or by using chemo and regioselective reactions carried out by Corey in the total synthesis of the erythronolide-A.

References

Conforth, J.W., 1994, The Trouble with Synthesis, *Aldrichimica Acta*, 27(3), 71-77.

Corcoran, J.W., 1981, Biochemical Mechanism in the Biosynthesis of Erythromycins in **Antibiotics Vol.IV: Biosynthesis**, Corcoran J.W.(Ed), Springer-Verlag, Berlin-New York, 132-174.

Corey, E.J. and Cheng, X.M., 1989, **The Logic of Chemical Synthesis**, John Wiley & Sons, New York-Singapore, 1-3.

Corey, E.J.; P.B. Hopkins; S. Kim; S.-e. Yoo; K.P. Nambiar; and J.R. Falck, 1979, **J. Am. Chem. Soc.**, **101**, 7131.

Corey, E.J.; S. Kim; S.-e. Yoo; K.C. Nicolaou; and L.S. Melvin, Jr.; D.J. Brunelle; J.R. Falck; E.J. Trybulski; R. Lett; and P.W. Sheldrake, 1978b, **J. Am. Chem. Soc.**, **100**, 4620.

Corey, E.J.; E.J. Trybulski; L.S. Melvin, Jr.; K.C. Nicolaou; J.A. Secrist; R. Lett; P.W. Sheldrake; J.R. Falck; D.J. Brunelle; M.S. Haslanger; S. Kim; and S.-e. Yoo, 1978a, **J. Am. Chem. Soc.**, **100**, 4618.

Fuhrhop, J. and G. Penzlin, 1984, Chlorophyll a, - Comprehension of Structural Features and Synthesis; Corrins; and Macrolides in **Organic Synthesis. Concepts, Methods, Starting Materials**, Verlag Chemie, 233-235; 235-238; dan 290-291.

March, J., 1985, Stereochemistry dalam **Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms, and Structures**, John Wiley & Sons, New York-Singapore, 82-130.

Nakagawa, A. and S. Omura, 1984, Structure and Stereochemistry of Macrolides in **Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice**, S.Omura (Ed), Academic Press, Inc., Orlando-Tokyo, 37-84.

Ollis, W.D., 1980, Robert Burns Woodward, - an Appreciation, **Angew. Chem.**, 210-215.

Umar A. Jenie

Schomburg, D.; P.B. Hopkins; W.N. Lipscomb; and E.J. Corey, 1980, **J. Org. Chem.**, **45**, 1544.

Streitwieser, A. and C.H. Heathcock, 1976, **Introduction to Organic Chemistry**, Macmillan Publishing Co. Inc., New York.

Woodward, R.B., 1956, **Perspective in Organic Chemistry**, A.R. Todd (Ed), Interscience, New York, 155-184.

Woodward, R.B., 1960, Totalsynthese des Chlorophylls, **Angew. Chem.**, **72**, 651-662.

Insecticidal Compounds from Indonesian Plants

Unang Supratman,¹⁾ Tri Mayanti,¹⁾ Tati Herlina,¹⁾ Euis Julaeha,¹⁾ Nurlelasari,¹⁾ Desi Harneti,¹⁾ and Hideo Hayashi²⁾

¹⁾Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padjadjaran University, Jatinangor, Sumedang 40600

Corresponding author. Tel: 62-22-7794391; Fax: 62-22-7794391

E-mail: unang04@hotmail.com

²⁾Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8431, Japan

Abstract

During the random screening of Indonesian plants for insecticidal compounds, *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* were found to show a potent insecticidal activity against the third larvae of silkworm (*Bombyx mori*).

K. pinnata leaves were shown to produce a new insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, and a known bufadienolide, bryophyllin A, together with an inactive bersaldegenin-3-acetate, meanwhile a new insecticidal bufadienolide, methyl daigremonate and three known bufadienolides, bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate, daigremontianin, and bersaldegenin-1-acetate were isolated from the leaves of *K. daigremontiana*.

In order to clarify the functional groups responsible for the insecticidal activity, two α -pyrone opening derivatives were prepared and their insecticidal activity was compared with those of other bufadienolides. As a result, both the orthoacetate and α -pyrone moiety seemed to be essential structural elements for exhibiting a potent insecticidal activity. In addition, oxygenated substituents at C-11 and C-12 in ring C enhanced the insecticidal activity.

Keywords: *Kalanchoe*; *Crassulaceae*; *Bufadienolide*; *Bryophyllin*; *Insecticidal activity*

1. Introduction

In the course of our continuing search for novel insecticidal compounds from Indonesian plants, we isolated and described two insecticidal bufadienolides, bryophyllin A (**1**) and C (**2**), along with an inactive bufadienolide, bersaldegenin-3-acetate (**3**), from the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Supratman, *et al.*, 2000). In a further research for insecticidal compounds from Indonesian *Kalanchoe* (syn. *Bryophyllum*) species, we found that methanolic extract of *Kalanchoe daigremontiana* produced four insecticidal bufadienolides, bryophyllin A, daigremontianin (**4**), bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate (**5**), methyl daigremonate (**6**), together with an inactive bufadienolide, bersaldegenin-1-acetate (**7**) (Supratman, *et al.*, 2001) (Figure 1).

In order to confirm the functional groups responsible for insecticidal activity, bufadienolides **1** and **4** were chemically transformed by treating with a base, followed by treating with an acid according to the partially modified procedure of a previous report (Kupchan, *et al.*, 1969 and 1971). We now report on chemical transformation of active bufadienolides and their structure-insecticidal activity relationship.

2. Experimental

Materials and Chemicals

Compounds **1** and **5** were obtained from our previous investigations. Chromatographic separations were carried out on Wakogel C-200 (Wako Pure Chemical Industries), silica gel 60 (Merck), and Chromatorex ODS (Fuji Silysia, Japan) adsorbents.

Instrumentation

Melting points were uncorrected; optical rotation was measured using a Horiba model SEPA-300 polarimeter; UV spectra were recorded on a Hitachi model U-3210 spectrophotometer; IR spectra on a Perkin-Elmer 1760X in KBr; mass spectra were recorded on a JEOL JMS-DX300 and Kratos PC-Kompact MALDI instruments; ^1H and ^{13}C NMR spectra were obtained using a JEOL JNM A-500 spectrometer with TMS as internal standard.

Silkworm bioassay (Hayashi, *et al.*, 1989)

Larvae of *Bombyx mori* were used for the bioassay, and were cultured on an artificial diet purchased from Nippon Nosan Kogyo Co., Ltd. To one gram of the diet, 100 μl of the methanol extract or a certain amount of the sample to be tested was added in a petri dish. After removing the solvent, five larvae of the third instar stage were introduced into the petri dish, and the mortality rate of the silkworm was observed within 24 hours at 25°C after initiating the administration.

3. Results and Discussion

Bryophyllin A (**1**) was treated with a solution of sodium hydroxide in methanol for 30 minutes at room temperature. The reaction mixture was cooled to 0°C, acidified with 5% sulphuric acid, and extracted with chloroform. The chloroform extract was washed with water and evaporated, and the residue obtained was subjected to column chromatography on Kieselgel 60 and Chromatorex ODS to yield a chemically transformed product (**8**, 2.4 mg). The NMR spectra of **8** was quite similar to that of bryophyllin A (Supratman, *et al.*, 2000), except the absence of an α -pyrone ring and the appearance of a *trans* olefine [δ_{H} 5.63 (1H, d, $J=15.3$ Hz) and 7.19 (1H, d, $J=15.3$ Hz)], an olefenic [δ_{H} 6.53 (1H, s)], and a carbomethoxyl group [δ_{H} 3.73 (3H, s)], indicating that **8** was an α -pyrone opening product of bryophyllin A. Consequently, **8** is determined to be methyl isobryophyllinate A, which appears to be the first report for an α -pyrone opening derivative of bryophyllin A (Fig 2).

Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate (**5**) was treated with a solution of sodium hydroxide in methanol for 30 minutes. The reaction mixture was worked up as described for methyl

isobryophyllinate A (**8**) and the residue was chromatographed successively on Kieselgel 60 and Chromatorex ODS to yield a chemically transformed product (**9**, 5.2 mg). The NMR spectra of **9** was quite similar to that of bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate A (Supratman, *et al.*, 2001), except the absence of an α -pyrone ring and the appearance of a *trans* olefine [δ_{H} 5.62 (1H, d, $J=15.3$ Hz) and 7.20 (1H, d, $J=15.3$ Hz)], an olefenic [δ_{H} 6.50 (1H, s)], and a carbomethoxyl group [δ_{H} 3.70 (3H, s)], indicating that **9** was an α -pyrone opening product of bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate. Consequently, **9** is determined to be methyl isobersaldegenin-1,3,5-orthoacetate (Fig 2).

The insecticidal activity of bufadienolides (**1-7**) together with two synthetic derivatives (**8** and **9**) were evaluated against the third instar larvae of silkworm according to a procedure described previously. Insecticidal activity of these compounds are summarized in Table 1 using LD₅₀ (50% lethal dose) values. Of these bufadienolides, bufadienolides having both orthoacetate and α -pyrone opening type of bufadienolides like in **3**, **6**, **7**, **8**, and **9** showed a weak or no activity at concentration of 100 $\mu\text{g/g}$ of diet. These results indicated that an orthoacetate and α -pyrone moieties were essential structural elements for exhibiting the insecticidal activity.

In addition, daigremontianin (**4**) having oxygenated substituents at C-11 and C-12 showed the strongest activity among these compounds, indicating that the oxygenated substituents at C-11 and C-12 in ring C enhanced the insecticidal activity.

4. Acknowledgements

The authors express their gratitude to Dr. Tomoyuki Fujita and Dr. Kohki Akiyama of the Division of Applied Biological Chemistry, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan for NMR and MS measurements.

5. References

Hayashi, H., Takiuchi, K., Murao, S., Arai, M., 1989. Structure and insecticidal activity of new indole alkaloids, okaramines A and B, from *Penicillium simplicissimum* AK-40. *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 461-469.

Kupchan, S., and Ognyanov, I., 1969. The isolation and structural determination of novel naturally-

occurring bufadienolide orthoacetates. *Tetrahedron Lett.*, **20**, 1709-1712

Kupchan, S., Hemingway, R.J., and Hemingway, J.C., 1969. Tumor inhibitor XLIV. The isolation and characterization of hellebrigenin-3-acetate and hellebregenin-3,5-diacetate, bufadienolide tumor inhibitors from *Bersama abyssinica*, *J. Org. Chem.*, **12**, 3894-3898.

Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., and Hayashi, H., 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1309-1311.

Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., and Hayashi, H., 2001. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontiana*. *Phytochemistry*, **58**, 311-314.

Appendix

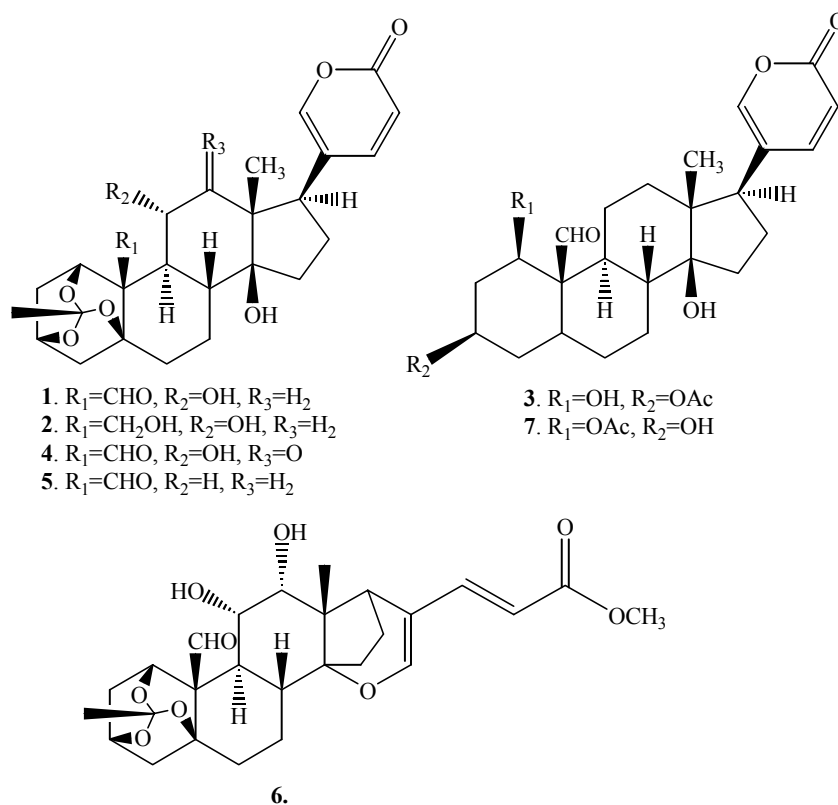


Fig. 1. Structure of bufadienolides

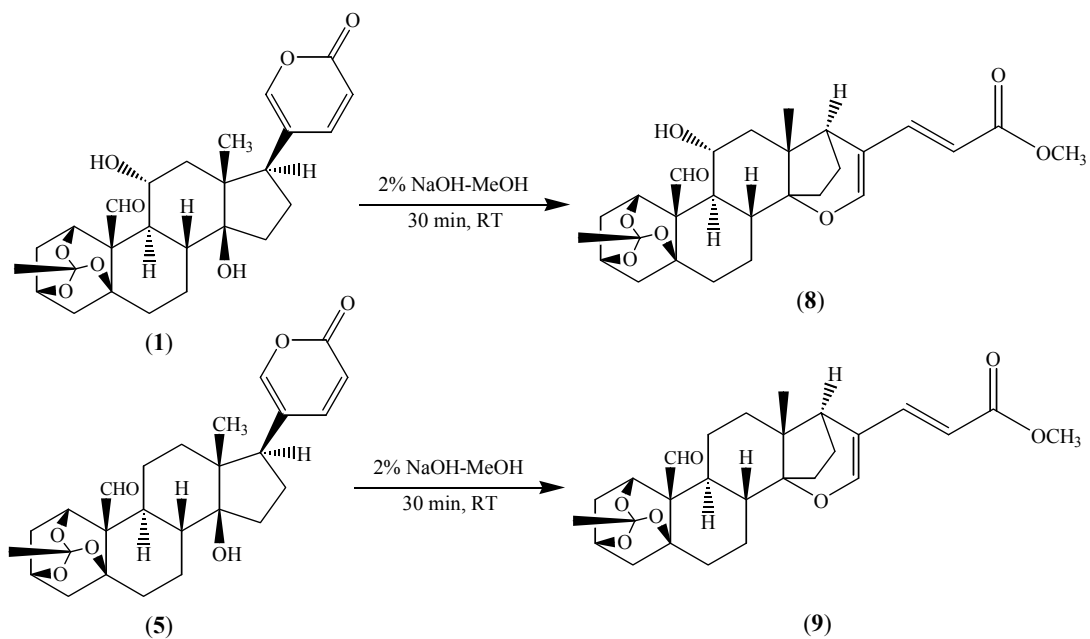


Fig. 2. Chemical Transformation of Bufadienolides

Table.1. Insecticidal Activity of Bufadienolides^{a)}

Compounds	LD ₅₀ µg/g of diet
Bryophyllin A (1)	3
Bryophyllin C (2)	5
Bersaldegenin-3-acetate (3)	> 100
Daigremontianin (4)	0.9
Bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate (5)	20
Methyl daigremonate (6)	80
Bersaldegenin-1-acetate (7)	> 100
Methyl isobryophyllinate (8)	> 100
Methyl isobersaldegenin-1,3,5-orthoacetate (9)	> 100

a) Oral administration

Termodinamika pada Berbagai Ranah Keadaan dan Rekonstruksi Molekularnya.

Susanto Imam Rahayu
Departemen Kimia
Institut Teknologi Bandung.

Abstrak

Termodinamika merupakan ilmu yang merambah semua bentuk sistem di alam. Saat ini termodinamika berkembang bukan hanya di ranah keadaan setimbang, tetapi juga di daerah tak setimbang yang melibatkan proses-proses tak reversibel. Untuk itu akan dibahas bentuk termodinamika di tiga ranah keadaan, yaitu: keadaan setimbang, keadaan dekat setimbang dan keadaan jauh dari setimbang, yang masing-masing memiliki ciri dan perilaku tersendiri. Sejalan dengan itu berkembang pula pendekatan molekular pada keadaan setimbang, dekat setimbang dan jauh dari setimbang. Bila ranah setimbang telah sepenuhnya difahami, maka ranah dekat setimbang, yang secara nyata menggambarkan proses-proses yang berlangsung di alam, mulai difahami pada tataran fenomenologi maupun molekular. Sebaliknya, keadaan jauh dari setimbang masih merupakan tantangan besar, meskipun saat ini tampak perkembangan yang menarik. Berbeda dengan keadaan dekat setimbang yang dapat dikembalikan ke keadaan setimbang, sistem pada keadaan jauh dari setimbang tidak selalu dapat dikembalikan ke keadaan setimbang. Sistem semacam itu dxapat secara spontan berubah menghasilkan struktur baru yang belum ada sebelumnya dan tidak diramal sebelumnya, melalui proses yang dikenal sebagai *self organization*. Melalui konsep ini, yang dipelajari pada sistem-sistem terbuka, termodinamika mulai merambah berbagai sistem, antara lain: sistem biologi, sistem informasi dan sistem sosial. Akan dibahas apa yang harus dilakukan pada sistem perkuliahan kimia agar dapat mengantisipasi perkembangan ini di masa depan.

Pendahuluan.

Sebagai suatu ilmu tentang keadaan makroskopik, termodinamika memiliki tempat khusus karena semua sistem fisik di alam mengikuti hukum-hukum termodinamika. Bermula dari azas kekekalan energi yang dikenal sebagai Hukum Pertama, kemudian diikuti dengan Hukum Kedua yang menyangkut arah proses spontan, termodinamika telah berkkembang pesat. Dikenal sebagai **termodinamika klasik**, ilmu ini telah berhasil menjelaskan berbagai gejala pada sistem-sistem setimbang. Seiring dengan itu, berkembang pula rekonstruksi molekular dari termodinamika klasik, yang dikenal sebagai **mekanika statistik** atau **termodinamika statistik**. Melalui ini berbagai ramalan termodinamika telah mendapatkan lamdasan molekularnya, sehingga menambah keyakinan akan kebenarannya.

Meskipun telah berhasil di ranah keadaan setimbang, tetapi tidak semua sistem di alam ada dalam keadaan setimbang. Bahkan semua proses yang dapat berlangsung akan terjadi dalam suatu sistem yang tak setimbang. Karena itu berkembanglah cabang baru, yaitu **termodinamika tak-setimbang** atau **termodinamika tak-reversibel**. Ranah keadaan tak-setimbangpun saat ini dibagi dua, yaitu ranah keadaan **dekat** kesetimbangan, dan ranah keadaan **jauh** dari kesetimbangan. Ternyata kedua keadaan ini memiliki sifat-sifat yang berbeda. Makalah ini bertujuan untuk memperkenalkan berbagai hal yang menyangkut termodinamika keadaan tak-setimbang, beserta rekonstruksi molekularnya, serta meninjau cara pengajaran termodinamika saat ini yang pada umumnya masih mengabaikan keadaan tak-setimbang ini.

Ranah Keadaan Setimbang.

Salah satu keberhasilan utama termodinamika adalah di ranah keadaan setimbang. Pengembangannya yang secara tuntas dikenal sebagai termodinamika klasik bertolak dari hukum-hukum dasar termodinamika, yaitu Hukum Pertama dan Hukum Kedua. Baru kemudian disadari perlunya ada Hukum Ketiga, dan kemudian juga adanya Hukum Ketiga. Meskipun demikian bobot utama dari perkembangan termodinamika klasik bertumpu pada Hukum Pertama dan Hukum Kedua.

Pada awal perkembangannya termodinamika disibukkan dengan Hukum Pertama, yaitu azas kekekalan energi dan massa. Usaha-usaha ini adalah untuk menampik hidupnya pandangan bahwa energi dapat dihasilkan dari ketiadaan. Semenjak itu mulai disadari akan keterbatasan energi, serta dilakukan berbagai usaha untuk penghematan dan pengeffisienan penggunaan energi.

Hukum Kedua termodinamika memasukkan konsep entropi, sedemikian rupa sehingga bagi suatu sistem tersekat setiap proses spontan akan meningkatkan entropi sistem hingga tercapai keadaan setimbang, di mana entropi sistem adalah maksimum. Hukum Kedua ini telah memasukkan konsep kesearahan proses spontan atau tak-reversibel, yaitu arah proses sedemikian rupa sehingga bagi sistem tersekat

$$dS > 0$$

Namun termodinamika keadaan setimbang **tidak** memberikan rumusan khusus secara bagaimana produksi entropi itu berlangsung.

Kemajuan terbesar tercapai melalui penggabungan kedua hukum tersebut, yang menghasilkan konsep potensial termodinamika, yaitu: energi dalam, entalpi, energi bebas Gibbs dan Helmholtz. Melalui konsep ini dikembangkan **kriteria kestabilan** sistem, yaitu keadaan dengan harga potensial termodinamika terendah, sesuai dengan kendala batasnya. Pada tekanan dan suhu tetap, keadaan setimbang adalah keadaan dengan harga energi bebas Gibbs terendah, sedangkan pada entropi dan volum tetap keadaan setimbang adalah keadaan dengan harga energi dalam terendah. Jadi, apabila terjadi fluktuasi entropi dan volum, akan terjadi perubahan energi dalam

$$\Delta U = \delta^{(1)}U + \delta^{(2)}U + \dots$$

Dengan harga U minimum, maka $\delta^{(1)}U = 0$ dan $\delta^{(2)}U > 0$. Yang terakhir ini menghasilkan syarat kestabilan $c_v > 0$ dan $\beta > 0$, dengan β kompresibilita isothermal, sedemikian sehingga tiap fluktuasi dari keadaan setimbang akan menaikkan energi dalam sehingga dikembalikan ke keadaan setimbang lagi. Selain itu, termodinamika mampu mengaitkan satu kelompok pengamatan dengan kelompok lain. Sebagai contoh: $c_p - c_v = \frac{\alpha^2 v T}{\beta}$, dimana

α adalah koefisien muai isothermal, yang berarti bahwa pengamatan termal dapat diperoleh dari data persamaan keadaan.

Sejalan dengan keberhasilan termodinamika dalam menganalisis fenomena makroskopik, berkembang pula pendekatan molekular, di mana suatu sistem dianggap sebagai kumpulan molekul-molekul yang secara mekanika berinteraksi melalui aturan tertentu. Pendekatan ini dapat diartikan sebagai merekonstruksi sistem termodinamika secara molekular. Sifat makroskopik sistem diperoleh dengan melakukan perata-rataan statistik untuk sifat-sifat sistem banyak partikel (dengan orde 10^{23}), yang menjadikannya suatu bidang ilmu baru yaitu mekanika statistik atau termodinamika statistik. Berbeda dengan termodinamika klasik yang memasalahkan **perubahan** harga suatu besaran makroskopik secara fenomenologi sebagai akibat perubahan harga variabel bebasnya, maka termodinamika statistik bertujuan **menghitung** harga dari berbagai besaran makroskopik. Kesesuaian antara harga yang dihitung dengan pengamatan merupakan ukuran dari keabsahan pendekatan.

Keakuratan harga yang dihitung ternyata sangat bagus. Sebagai contoh, bagi kapasitas kalor molar gas beratom tunggal termodinamika statistik menghasilkan harga $c_v = \frac{3}{2}R$, sesuai pengamatan. Demikian pula, pemodelan kristal melalui pendekatan Debye menghasilkan $c_v \rightarrow 3R$ pada suhu tinggi dan $c_v \propto T^3$ pada suhu $T \rightarrow 0^0 K$, sesuai pula dengan pengamatan. Yang cukup penting adalah keberhasilannya memberikan ungkapan bagi entropi molar gas beratom tunggal sebagai fungsi suhu dan volum molar,

$$s = R \ln \left[\left(\frac{2\pi m k T}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{v e^{\frac{5}{2}}}{N_A} \right]$$

dengan N_A bilangan Avogadro, sesuatu yang tak mungkin diperoleh dari termodinamika klasik. Dengan kedua pengembangan yang parallel ini, terbentuklah kaitan antara gambaran mikroskopik dengan sifat makroskopik.

Ranah Keadaan dekat Setimbang.

Ciri utama sistem termodinamika yang tak setimbang adalah adanya ketidak-seragaman atau ketidak-homogenan harga besaran intensifnya. Dengan kata lain, di dalam sistem akan ada **gradien harga** besaran intensif, seperti: suhu, kerapatan, tekanan atau potensial kimia. Sebagai akibat adanya berbagai gradien ini, yang juga disebut sebagai **gaya** termodinamika, di dalam sistem akan didapati berbagai **aliran** atau **fluks** yang sehubungan dengan gradien tertentu. Gradien suhu akan menghasilkan aliran atau fluks energi, gradien konsentrasi atau potensial kimia akan menghasilkan aliran zat atau difusi, sedangkan gradien kerapatan momentum menghasilkan aliran viskose. Keadaan sistem semacam ini bertolak belakang dengan persyaratan bagi berlakunya termodinamika klasik, yaitu keseragaman harga variabel intensif. Ini berarti hasil-hasil termodinamika klasik **tidak** dapat digunakan untuk memahami sistem tidak setimbang, sehingga perlu dikembangkan secara tersendiri termodinamika tidak setimbang atau termodinamika tak reversibel.

Analisis sistem tak setimbang didasarkan atas perubahan entropi sistem, dS , yang dalam hal ini terbagi menjadi dua sumbangan

$$dS = d_e S + d_i S$$

dengan $d_e S$ adalah **pertukaran** entropi antara sistem dengan lingkungan atau alam sekitarnya, sedangkan $d_i S$ adalah **produksi** entropi di dalam sistem sebagai akibat proses-proses tak reversibel. Berdasarkan Hukum Kedua harus berlaku

$$(d_i S) \geq 0$$

sedangkan $d_e S$ dapat positif atau negatif bergantung besar aliran entropi masuk atau keluar sistem. Bagi sistem tersekat tidak ada antaraksi entropi dengan sekiranya, $d_e S = 0$, sehingga

$$(dS)_E \geq 0$$

Apabila produksi entropi sistem dinyatakan sebagai

$$d_i S = \int \sigma dV$$

dengan σ produksi entropi per satuan waktu per satuan volum, maka berdasar Hukum Kedua haruslah

$$\sigma \geq 0$$

Dalam hal inilah termodinamika ranah dekat setimbang lebih maju dari termodinamika setimbang, karena memberi rumusan bagi produksi entropi per satuan waktu per satuan volum, yang diungkapkan terhadap fluks dan gaya yang ada pada sistem dalam bentuk

$$\sigma = \sum_j J_j X_j$$

Fluks hanya terjadi apabila ada gaya di dalam sistem, sehingga fluks merupakan fungsi dari gaya-gaya tersebut. Dalam ranah dekat setimbang, dapat digunakan bentuk kefungsiannya yang paling sederhana yaitu bentuk **linear**. Untuk itu persamaan bagi fluks adalah

$$J_j = \sum_k L_{jk} X_k$$

dengan L_{jk} adalah **koeffisien fenomenologi**, yang memberikan sumbangan gaya X_k pada fluks J_j . Menggunakan bentuk ini, produksi entropi menjadi bentuk kuadrat dalam gaya-gaya, yang harganya harus selalu positif berdasar Hukum Kedua

$$\sigma = \sum_j \sum_k L_{jk} X_j X_k > 0$$

Secara matematik, kepastian positif ini terpenuhi apabila koeffisien fenomenologi yang **diagonal** berharga positif, yaitu $L_{jj} > 0$. Yang terakhir ini berakibat bahwa beberapa koeffisien transport, seperti koeffisien hantaran kalor λ serta koeffisien difusi D harus berharga positif, sesuai dengan pengamatan.

Ada dua hal penting lain yang menyangkut produksi entropi ini. Yang **pertama** menyangkut koeffisien-koeffisien fenomenologi yang **luar diagonal** L_{jk} . Untuk ini Onsager menunjukkan bahwa dengan pemilihan gaya dan fluks yang tepat koeffisien

ini memenuhi **azas timbal balik** (*reciprocal relations*) berikut

$$L_{jk} = L_{kj}$$

Artinya, sumbangan gaya X_k pada fluks J_j akan sama besar dengan sumbangan gaya X_j pada fluks J_k . Kesimpulan ini bersifat umum dan berakibat luas, sehingga dapat diterapkan pada tiap pertautan (*coupling*) antara dua gaya termodinamika yang berbeda. Dalam hal pertautan antara aliran kalor dengan difusi, azas Onsager ini menyatakan bahwa sumbangan gradien suhu pada aliran difusi akan sama dengan sumbangan gradien konsentrasi pada aliran kalor. Keberadaan kedua efek ini telah diamati kebenarannya, dalam apa yang dikenal sebagai efek Soret dan efek Duffour. Untuk ini Onsager memperoleh penghargaan Hadiah Nobel.

Yang **kedua** menyangkut **kriteria kestabilan** bagi sistem tak setimbang. Apabila dalam termodinamika ranah setimbang dikembangkan azas kestabilan, sedemikian rupa sehingga keadaan setimbang sesuai dengan harga potensial termodinamika yang minimum, maka bagi termodinamika ranah dekat setimbang terdapat pula azas kestabilan yang dikembangkan oleh Prigogine. Keadaan stabil di sini adalah keadaan *steady state*, yang dibuktikan oleh Prigogine sebagai keadaan dengan **produksi entropi yang minimum**. Azas produksi entropi minimum ini berlaku bagi ranah dekat setimbang, dengan persamaan fenomenologi yang ketat linear, yaitu dengan koefisien-koefisien L_{jk} yang merupakan tetapan. Azas ini berarti bahwa dalam masalah kestabilan sistem, bagi ranah dekat setimbang produksi entropi memiliki peran yang sama dengan peran potensial termodinamika bagi ranah setimbang.

Rekonstruksi molekular sistem tak setimbang belum semaju rekonstruksi sistem setimbang. Yang relatif sangat berkembang adalah bagi sistem gas, melalui teori kinetik gas yang merupakan pula bidang penelitian Kelompok Kimia Teori dan Kimia Komputasi di ITB. Perilaku sistem diikuti melalui konsep fungsi distribusinya, $f(v)$. Perubahan f dengan waktu diberikan oleh persamaan integro-diferensial berikut

$$\frac{\partial f}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \frac{\partial f}{\partial \mathbf{r}} = \int (ff'_1 - ff_1) g \frac{d\Sigma}{d\Omega} d\mathbf{v}_1$$

yang dikenal sebagai persamaan Boltzmann. Dengan mendefinisikan entropi sistem sebagai

$$S = -k \int f(v) \ln f(v) d\mathbf{v}$$

Boltzmann membuktikan bahwa produksi entropi adalah

$$\frac{dS}{dt} = k \int \ln \frac{ff'_1}{ff_1} (ff'_1 - ff_1) g \frac{d\Sigma}{d\Omega} d\mathbf{v}_1 d\mathbf{v} \geq 0$$

sehingga memberikan rumusan bagi mekanisme produksi entropi. Produksi entropi berhenti saat tercapai entropi maksimum, dengan $\frac{dS}{dt} = 0$, yang dalam teori kinetik gas adalah keadaan *steady state*. Fungsi distribusi kecepatan yang memenuhi keadaan ini adalah fungsi distribusi kecepatan Maxwell, $f^{(0)}$.

Dengan mengembangkan penyelesaian di sekitar fungsi Maxwell melalui pendekatan bertahap, penyelesaian persamaan Boltzmann diberikan dalam bentuk

$$f(v) = f^{(0)}(v) + \xi f^{(1)}(v) + \xi^2 f^{(2)}(v) + \dots$$

dengan ξ adalah parameter uraian yang sebanding dengan simpangan sistem dari keadaan *steady state*.

Bagi ranah dekat setimbang, digunakan pendekatan linear dengan mengambil hanya koreksi orde pertama,

$$f(v) = f^{(0)}(v) + \xi f^{(1)}(v)$$

yang dikenal sebagai tahap pendekatan **Navier-Stokes**. Menggunakan bentuk $f^{(1)}(v) = f^{(0)}(v)\phi(v)$, fungsi gangguan ϕ diberikan sebagai kombinasi linear gaya-gaya termodinamika

$$\phi(v) = C_1(v)X_1 + C_2(v)X_2 + \dots$$

dengan gaya X_j adalah gaya yang menyebabkan aliran besaran ψ_j (energi, massa, momentum, dsb.) dalam bentuk fluks J_j . Dengan V adalah kecepatan termal molekular, yaitu selisih antara kecepatan v dan kecepatan rata-rata u , dapat ditunjukkan bahwa koefisien-koefisien fenomenologi dapat diperoleh melalui ungkapan-ungkapan berikut

$$L_{jj} = \int f^{(0)} V \psi_j C_j d^3 V$$

$$L_{jk} = \int f^{(0)} V \psi_j C_k d^3 V$$

$$L_{kj} = \int f^{(0)} V \psi_k C_j d^3 V$$

Hasil-hasil selama ini, baik pekerjaan kami maupun di pustaka menunjukkan bahwa $L_{jj} > 0$ sesuai dengan persyaratan bagi kepositifan produksi entropi, dan bahwa $L_{jk} = L_{kj}$ yang menunjang azas timbal-balik Onsager. Sebagai contoh, azas ini telah kami cek dalam sistem bereaksi melalui sistem gas empat komponen yang mengalami reaksi dua arah $A + B \rightleftharpoons C + D$. Dengan pertolongan teori kinetik gas, telah terbukti bahwa koefisien-koefisien fenomenologinya memenuhi hubungan $L_{\alpha\beta} = L_{\beta\alpha}$, dengan α dan β adalah dua gaya berbeda dari jenis gradien suhu, konsentrasi atau momentum. Hasil ini menunjukkan bahwa azas Onsager tak dipengaruhi adanya reaksi kimia. Dengan demikian rekonstruksi molekular telah menunjang termodinamika ranah dekat setimbang.

Selain mengkonfirmasi berbagai hasil termodinamika tak setimbang, teori kinetik gas telah berhasil pula menghitung berbagai besaran transport gas yang sebelumnya hanya merupakan besaran hasil eksperimen. Besaran yang dapat dihitung antara lain adalah: koefisien hantaran kalor λ , koefisien viskositas geser η , koefisien viskositas ruah κ dan koefisien difusi D , baik dalam pendekatan klasik, semi-klasik maupun kuantum. Pengaruh berbagai gangguan pada proses transport telah pula dipelajari, antara lain pengaruh reaksi kimia yang menghasilkan ungkapan koefisien transport berikut

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1$$

$$\frac{\lambda}{\lambda_0} = 1 + \frac{2}{3} n \pi \sigma^3 \left(1 + 2 \frac{\varepsilon^*}{kT} \right)$$

$$\kappa = \frac{n \pi \sigma}{6} \left(\frac{mkT}{\pi} \right)^{1/2} \left(1 + \frac{27}{4} \frac{\varepsilon^*}{kT} \right)$$

Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa rekonstruksi molekular di ranah keadaan dekat

setimbang telah menghasilkan pula ungkapan-ungkapan berbagai besaran yang sebelumnya belum pernah teramati.

Ranah Keadaan jauh dari Setimbang.

Apabila gradien-gradien besaran intensif dalam sistem diperbesar lebih lanjut, sistem dibawa lebih menjauh dari keadaan setimbang. Pada harga gradien yang cukup besar, akan terjadi keadaan yang disebut keadaan **jauh dari setimbang**, dicirikan oleh harga fluks yang **tidak** lagi linear terhadap gaya seperti pada ranah dekat setimbang. Sebagai halnya dengan matematika non-linear, hilangnya hubungan linear antara fluks dengan gaya menimbulkan berbagai gejala baru, seperti chaos dan *bifurcation*, yaitu terbelahnya keadaan menjadi dua atau lebih kemungkinan. Selain itu, berbeda dengan keadaan dekat setimbang yang selalu mungkin dibawa kembali ke keadaan setimbang, tidak selalu mungkin membawa keadaan jauh dari setimbang kembali ke keadaan setimbang.

Kajian teori tentang gejala-gejala yang berlangsung dalam sistem pada keadaan jauh dari setimbang dipelopori oleh Prigogine (yang untuk itu ia memperoleh hadiah Nobel Kimia 1977) dipusatkan pada sistem-sistem terbuka, yaitu sistem yang dapat bertukar energi dan zat dengan lingkungannya. Kajian tentang masalah ini saat ini menarik banyak perhatian, mengingat potensinya untuk diterapkan ke dalam sistem biologi mengingat sistem biologi adalah sistem terbuka. Bila sistem terbuka dibawa ke ranah jauh dari setimbang, dan tidak dapat kembali ke keadaan setimbang, sistem dapat menjalani proses menarik yang oleh Prigogine disebut sebagai **pengorganisasian diri** (*self organization*). Yang terjadi adalah sistem yang ada dalam keadaan kacau jauh dari setimbang secara spontan, tanpa pengaruh dari luar, **mengubah** dirinya sendiri menghasilkan keadaan baru yang lebih teratur.

Mengingat keadaan lebih teratur berarti memiliki entropi lebih rendah, proses pengorganisasian diri nampak seolah bertentangan dengan Hukum Kedua, yang mensyaratkan proses spontan selalu disertai kenaikan entropi. Penurunan entropi sistem dicapai dengan melepas sejumlah besar entropi ke lingkungan, sehingga terjadi kenaikan entropi di alam semesta yang sejalan dengan Hukum Kedua. Proses pengorganisasian diri ini sering berupa munculnya suatu struktur baru

yang menghilangkan keadaan sebelumnya yang simetrik. Karena itu gejala ini disebut pula sebagai **proses perusakan simetri** (*symetry breaking process*).

Beberapa contoh pengorganisasian diri dapat diambil dari perubahan cuaca yang menimbulkan tornado di Amerika. Pertemuan udara dingin dari utara dengan udara panas dari selatan membuat menjadi udara menjadi sistem yang sangat menyimpang dari kesetimbangan. Sistem mereaksi dengan membentuk struktur baru, suatu vorteks udara dengan kekuatan tinggi yang dikenal sebagai **tornado**. Udara yang sebelumnya tidak berstruktur sekarang dibentuk menjadi putaran gas. Contoh lain adalah gejala efek **Benard**, yang terjadi apabila suatu cairan diletakkan di antara dua bidang parallel dengan bidang bawah dipanaskan. Apabila perbedaan suhu antara bidang bawah dan atas diperbesar lebih lanjut, saat perbedaan itu melampaui batas tertentu akan diamati terjadinya bentuk-bentuk geometri pada cairan. Bentuk-bentuk ini dikenal sebagai sel Benard.

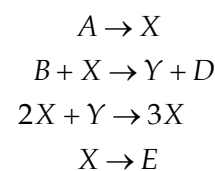
Sebagai hukum alam utama, Hukum Kedua berlaku bagi semua sistem, termasuk sistem biologi. Gejala pertumbuhan sel secara perlahan menjadi tumbuhan dan mahluk yang serba teratur, sehingga secara perlahan pula berlangsung penurunan entropi yang seolah tidak sejalan Hukum Kedua, kini dapat difahami melalui konsep pengorganisasian diri Prigogine. Penurunan entropi ini diimbangi dengan pelepasan entropi ke sekitarnya selama sel tersebut tumbuh, dengan mengubah masukan energi dan massa menjadi entropi yang dilepas ke luar.

Sejalan dengan itu otak pun merupakan sistem termodinamika yang masukan dan keluarannya adalah informasi, sehingga proses dalam otak pun dapat mengalami pengorganisasian diri, yang mungkin melatarbelakangi proses kreatifitas. Bila otak dipenuhi berbagai informasi yang saling bertentangan sehingga mengalami ketidak seimbangan yang besar, otak dapat keluar dengan konsep baru sama sekali, yang merupakan suatu keteraturan (*order*) baru sebagai jalan keluar dari ketidak-setimbangan. Otak yang tidak pernah didedahkan (*exposed*) pada tantangan karenanya sulit untuk menjadi kreatif (dalam konteks pengorganisasian diri).

Berbagai struktur baru, baik dalam lingkup waktu maupun ruang, yang dihasilkan oleh pengorganisasian diri terjadi dalam **sistem terbuka**. Kelangsungan struktur tersebut memerlukan keterbukaan sistem, yang mengambil sebagai masukan zat-zat dengan kadar energi tinggi tetapi entropi rendah, dan mengubahnya menjadi zat berkadar energi rendah tetapi entropi tinggi yang dilepas ke lingkungan sekitarnya. Dengan demikian terjadi proses dissipasi energi, sehingga bentuk-bentuk tersebut kemudian disebut oleh Prigogine sebagai **bentuk dissipatif** (*dissipative structure*). Makhluh hidup adalah salah satu contoh bentuk dissipatif!

Dengan mengambil contoh suatu sistem kimia terbuka yang di dalamnya dapat berlangsung berbagai reaksi, terdapat beberapa kemungkinan bentuk dissipatif yang dapat terjadi. Salah satunya adalah berlangsungnya **reaksi osilasi** (*oscillating reaction*), suatu reaksi yang bermula dari pengamatan Bellousov dan Zobotinskii dan yang sekarang sudah menjadi satu cabang sendiri dalam termodinamika dan kinetika kimia. Proses **perusakan simetri** dalam lingkup ruang telah pula diamati bagi sistem kimia, antara lain terjadinya pola-pola Turing. Kedua contoh ini akan dibahas.

Suatu sistem reaksi kimia dapat dibuat jauh dari kesetimbangan apabila konsentrasi pereaksi dan hasil reaksi dijaga tetap, dengan cara memasukkan pereaksi dan mengeluarkan hasil reaksi secara teratur. Agar terjadi bentuk dissipatif berupa reaksi osilasi, diperlukan adanya tahap **otokatalisis**. Suatu model reaksi yang banyak dipelajari adalah model "Brusselator", yang rangkaian reaksinya seperti berikut



dengan konsentrasi pereaksi-pereaksi *A* dan *B* dijaga tetap. Reaksi ketiga adalah suatu reaksi otokatalisis. Dengan menjadikan semua tetapan laju berharga satu, laju perubahan konsentrasi zat-zat antara *X* dan *Y* adalah

$$\frac{dX}{dt} = A - BX + X^2Y - X$$

$$\frac{dY}{dt} = BX - X^2Y$$

yang menghasilkan konsentrasi *steady state*

$X_{ss} = A$ dan $Y_{ss} = \frac{B}{A}$. Apabila sistem bergerak sekitar *steady state*, konsentrasi kedua zat antara dapat dinyatakan sebagai

$$X(t) = X_{ss} + x(t)$$

$$Y(t) = Y_{ss} + y(t)$$

yang pada linearisasi menghasilkan persamaan bagi perubahan x dan y dengan waktu

$$\frac{dx}{dt} = (B - 1)x + A^2y \equiv f(x, y)$$

$$\frac{dy}{dt} = -Bx - A^2y \equiv g(x, y)$$

Matriks Jacobian persamaan ini adalah

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} & \frac{\partial f}{\partial y} \\ \frac{\partial g}{\partial x} & \frac{\partial g}{\partial y} \end{bmatrix}$$

sehingga $Tr(J) = B - 1 - A^2$ dan $Det(J) = A^2$. Kestabilan titik *steady state* bergantung harga $Tr(J)$, yang adalah harga konsentrasi awal kedua pereaksi yang dibuat tetap. Titik akan stabil apabila $Tr(J) < 0$, di mana setiap gangguan akan kembali ke titik tersebut. Mengikuti teori Poincare-Bendixon, gerak osilasi terjadi apabila $Tr(J) \geq 0$, yang berarti konsentrasi pereaksi harus $B \geq 1 + A^2$. Ini berarti terbentuknya struktur dissipatif tidak cukup hanya membuat sistem jauh dari kesetimbangan, tetapi juga bergantung pada pengaturan harga batas dari sistem bersangkutan (gambar 1).

Dalam gambar 1, konsentrasi zat-zat dianggap homogen dalam sistem. Keadaan menjadi berbeda apabila konsentrasi zat tidak lagi homogen, sehingga ada gradien konsentrasi yang menimbulkan **proses difusi**. Pada persamaan bagi perubahan x dan y terhadap waktu perlu ditambahkan perubahan sebagai akibat difusi, yaitu

$$\frac{dx}{dt} = (B - 1)x + A^2y + D_x \frac{\partial^2 x}{\partial r^2}$$

$$\frac{dy}{dt} = -Bx - A^2y + D_y \frac{\partial^2 y}{\partial r^2}$$

Titik *steady state* sekarang diganggu bukan hanya oleh gangguan dalam waktu tetapi juga gangguan dalam ruang, dengan akibat konsentrasi zat-zat antara menjadi fungsi periodik dari ruang. Bila zat-zat tersebut berwarna, akan terbentuk pola-pola konsentrik, yang dikenal sebagai **pola Turing**. Apabila ruang sebelumnya adalah simetrik, timbulnya pola-pola ini merusak simetri, karenanya bentuk dissipatif ini disebut sebagai perusakan simetri (*symmetry breaking*).

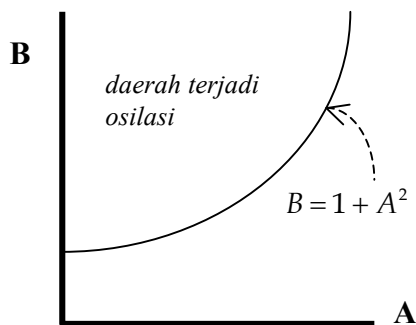
Rekonstruksi molekular pada ranah non-linear belum berkembang dengan baik, karena sulitnya masalah persamaan differensial yang tak linear. Dalam teori kinetik gas, keadaan jauh setimbang ini didapat dengan mengambil suku berikutnya dalam pendekatan penyelesaian persamaan Boltzmann, yaitu

$$f = f^{(0)} + \xi f^{(1)} + \xi^2 f^{(2)}$$

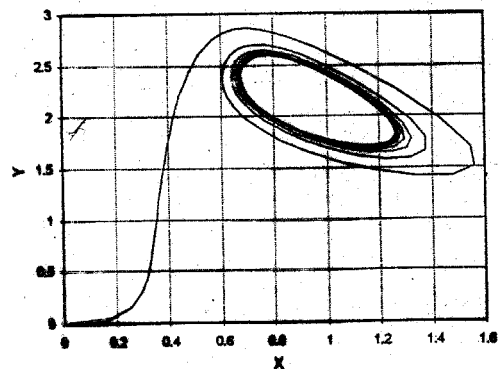
yang disebut sebagai pendekatan **Burnett**. Beberapa penyelesaian dalam bentuk penyederhanaan telah dilakukan, khususnya dalam masalah-masalah aliran jet dan rambatan supersonik, karena disitulah terjadi gradien-gradien yang tajam dalam berbagai besaran intensif.

Dalam usaha-usaha memperluas cakupan termodinamika ke arah sistem-sistem tak setimbang, baik yang dekat maupun yang jauh dari kesetimbangan, banyak dijumpai gejala-gejala yang tak dapat difahami melalui hukum-hukum termodinamika yang ada. Karena itu beberapa kalangan mulai melontarkan gagasan tentang Hukum Termodinamika Keempat, yang mencakup keadaan tak setimbang. Salah satu calon untuk itu adalah azas timbal-balik Onsager. Calon lain adalah azas produksi entropi minimum. Namun hingga saat ini belum ada kata sepakat tentang masalah ini.

Implikasi terhadap Pengajaran Termodinamika.



Daerah harga pereaksi yang menghasilkan reaksi osilasi.



Lintasan harga X dan Y pada osilasi.

Gambar 1

Pengajaran tentang termodinamika umumnya baru secara teratur diperoleh pada perkuliahan Kimia Fisika, dan dalam bentuk termokimia sederhana telah diberikan di kimia dasar maupun pendidikan menengah. Pada awal umumnya lebih menekankan pada kesadaran akan Hukum Pertama, yaitu kekekalan energi dan massa. Bila disimak isi perkuliahan Kimia Fisika, yang diajarkan sebenarnya bukan termodinamikanya, tetapi hasil-hasil terapan termodinamika.

Sebagian besar masih merupakan perhitungan yang menyangkut Hukum Pertama, sedangkan pembahasan Hukum Kedua sangat singkat. Pengajaran tentang energi bebas terlalu terkait dengan perhitungan tetapan kesetimbangan, yang seharusnya menekankannya sebagai akibat Hukum Kedua. Yang terakhir ini sering direduksi hanya sebagai perhitungan perubahan entropi saja, sedangkan arah proses maupun kemampuan Hukum Kedua dalam mangaitkan berbagai gejala alam kurang ditekankan.

Dari bahasan makalah ini, tampak bahwa Hukum Kedua merupakan hukum yang mengatur arah berbagai proses di alam, sehingga pemahaman tentang Hukum Kedua ini perlu diperbaiki. Ini hanya mungkin bila diberikan kuliah khusus mengenai Termodinamika itu sendiri, yang menekankan pengembangan konsep-konsepnya mulai dari premis dasar hingga ke akibat-akibatnya. Hal ini perlu karena diberikannya termodinamika hanya melalui hasil terapannya banyak menimbulkan kesalahan konsep, karena latar belakang dan premisnya tidak dikuasai.

Mengingat semua proses yang dapat berlangsung adalah pada sistem **tak setimbang**, pengajaran Kimia Fisika maupun termodinamika perlu mulai memasukkan beberapa aspek tentang Termodinamika Taksetimbang maupun Termodinamika Takreversibel. Demikian pula, pembahasan termodinamika perlu pula menyinggung sistem-sistem biologi karena hari depan pengembangan ilmu akan bergeser ke arah pemahaman yang lebih rasional tentang proses-proses biologi, khususnya melalui pendekatan molekular. Pengembangan termodinamika dalam ranah keadaan jauh dari setimbang telah menjadikan pemahaman proses biologi sebagai salah satu sasaran utamanya.

Penutup.

Dari bahasan ini dapat disimpulkan bahwa Hukum Kedua memiliki peran yang penting bagi pemahaman berbagai proses, baik di ranah setimbang maupun di ranah tak setimbang, dan karenanya perlu mendapatkan porsi yang setara dengan pentingnya pada pengajaran termodinamika atau terapannya. Untuk mempermudah pemahaman prediksi termodinamika, perlu diberikan kuliah yang khusus untuk memahami latar belakang termodinamika itu sendiri, mulai dari yang setimbang ke keadaan jauh darisetimbang.

Kepustakaan.

1. L. Tisza, *Generalized Thermodynamics* (MIT Press, Cambridge, 1966).
2. H. Reiss, *Methods of Thermodynamics* (Blaisdell, Waltham, Massachusetts, 1965).
3. H. B. Callen, *Thermodynamics*, 2nd Ed. (John Wiley, New York, 1985).

Susanto Imam Rahayu

4. S.R. de Groot & P. Mazur, *Non-Equilibrium Thermodynamics* (North-Holland, Amsterdam, 1969).
5. G. Nicolis, "Stability and Dissipative Structures in Open Systems Far from Equilibrium" dalam *Advances in Chemical Physics* Vol. XIX (John Wiley, New York, 1971).
6. I. Prigogine, *Thermodynamics of Irreversible Processes* (John Wiley, New York, 1961)
7. I. Prigogine, "Time, Structure and Fluctuations", Nobel Lecture, 1977.
8. P. Glendinning, *Stability, Instability and Chaos* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994).
9. S. Chapman & T.G. Cowling, *Mathematical Theory of Non-Uniform Gases*, 3rd Ed. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1970)
10. S. Imam Rahayu, *Teori Kinetik Gas* (Dirjen Pendidikan Tinggi, Jakarta, 2001)
11. B.C. Eu, *Kinetic Theory and Irreversible Thermodynamics* (John Wiley, New York, 1992).
12. Rebeka K. Adiwinata, "Landasan Kinetika bagi Pengaruh Reaksi Kimia pada Koefisien Fenomenologi", Tesis Magister, Program Pasca Sarjana, ITB, 1993.
13. S. Imam Rahayu, "Teori Antaraksi antara Reaksi Kimia dan Proses Diffusi dalam Campuran Gas-gas" (Lap. Penelitian no 11213191, ITB, 1995).
14. I.G.M. Sanjaya, "Kontribusi Reaksi Kimia dalam Teori Kinetik Gas", Dissertasi, Program Pasca Sarjana, ITB, 2004.
15. R.J. Field & M. Burger, *Oscillation and Travelling Waves in Chemical Systems* (John Wiley, New York, 1985)
16. I.R. Epstein & J.A. Pojman, *An Introduction to Nonlinear Chemical Dynamics* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1998).

Perilaku Peralihan Fasa Gegala(Pitch) Karbon Mesomorfik

Bambang Ariwahjoedi

Laboratoria Kimia Fisik Material
Departemen Kimia, FMIPA ITB
Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

TEL.+62 22 250 2103 FAX.+62 22 250 5154
e-mail: ari@chem.itb.ac.id

Abstrak

Perilaku mesofasa karbon pada gegala diperrumit oleh adanya kereaktifan kimia pada temperatur pengamatan serta oleh lebarnya rentang dari struktur molekul spesi-spesi yang berada dalam sistem gegala itu. Sementara kompleksitas ini menyarankan penggunaan aluran transformasi waktu/tempartur, pertimbangan perilaku fasa hipotetis dari gegala yang mengandaikan tidak adanya perubahan komposisi keseluruhan dengan waktu telah cukup membantu dalam interpretasi gejala termal yang diamati. Dalam makalah ini diusulkan dan dijelaskan konstruksi suatu diagram fasa yang dapat secara lebih umum dipakai dalam interpretasi maupun prediksi peralihan mesomorfik dalam sistem gegala karbon.

1. Pendahuluan

Gegala mesofasa karbon adalah merupakan fasa kristal cair termotropik (Gamb. 1) sebagaimana dilaporkan pertama kali pada tahun 1965 (Gamb. 2.A dan B)[1]. Bahkan pada tahun 1991 telah ditunjukkan bahwa mesofasa karbon yang telah ternitrasi dan tersulfonasi masih dapat membentuk fasa anisotropik meskipun melalui kristal cair lio/hidrotropik (Gamb.3.A dan B)[2-4]. Di literatur telah diusulkan diagram fasa bagi mesofasa karbon, yang merupakan analogi bagi diagram kristal cair nematik biasa (Gamb.4) [5]. Pada diagram fasa itu digunakan kandungan spesi meso dan bukan-meso mirip yang diperlukan pada teori kristal cair konvensional.

Dua tahun kemudian dipublikasi diagram fasa eksperimental dari fraksi larut dan tak-larut benzena bagi gegala ter-batubara[6]. Diagram fasa itu dilaporkan terdiri dari tiga fasa mantap yaitu cairan isotrop, kristal cair nematik dan kristal cair nematik bersama cairan isotrop sebagai fungsi komposisi dan suhu. Prediksi peralihan fasa gegala mesofasa sangat penting karena diagram ini mampu memberi informasi guna penyiapan gegala sebagai prazat dalam

proses manufaktur serat karbon. Barulah tahun 1997, dilaporkan aplikasi teori kristal cair dalam kalkulasi peralihan fasa gegala mesofasa[7].

Pada makalah ini dibahas faktor-faktor penyebab penyimpangan dari hasil kalkulasi Teori Medan Molekular dalam meramalkan diagram fasa hasil percobaan. Selain itu pada makalah ini juga dipaparkan berbagai faktor perbaikan bagi perhitungan yang tengah dilakukan terhadap Teori Medan Molekular Kristal Cair.Humphries-Luckhurst[8]. Faktor perbaikan dirumuskan berdasarkan mekanisme asosiasi yang diusulkan oleh Hurt *dkk.*[9]

2. Teori Medan Molekular Bagi Kristal Cair

Menurut Humphries dan Luckhurst[8] sistem gegala mesofasa dianggap dapat berada dalam satu di antara tiga keadaan yaitu cairan isotropik, kristal cair nematik dan campuran kristal cair nematik dengan cairan isotropik. Pada suhu dan komposisi (serta tekanan) tertentu keadaan mantap dari sistem biner akan memiliki fungsi energi bebas Helmholtz yang terendah. Pertama ditentukan energi potensial anisotropik semu bagi molekul tunggal dengan merata-rata ungkapan umum interaksi antara

dua molekul pada semua koordinat molekul. Hubungan antara sumbu panjang (molekul berbentuk batangan) dan sumbu optik mesofasa diberikan pada Gamb. 5. Energi potensial anisotropik semu bagi molekul mesogen tunggal dinyatakan sebagai

$$U_m(\theta) = x \varepsilon P_2' P_2 (\cos \theta) \quad (1)$$

dengan θ sudut antara sumbu panjang molekul dengan sumbu optik mesofasa, x fraksi mol mesogen, P_2' parameter keteraturan orientasi jarak jauh, ε parameter energi potensial anisotropi menurut teori Maier-Saupe [7] yang kaitannya dengan suhu peralihan fasa kristal cair murni T_{NI} dapat dinyatakan sebagai

$$\varepsilon = -4,541 k_B T_{NI}$$

P_2 adalah fungsi Legendre jenis kedua yang di dalam konteks ini dapat dinyatakan sebagai

$$P_2 = [(3\cos^2 - 1)/4] \ln [(1 + \cos \theta) / (1 - \cos \theta)] - 3\theta/2 \quad (2)$$

P_2' pada Pers. (1) dinyatakan dengan integral

$$P_2' = \int_0^{\pi/2} P_2 (\cos \theta) \exp[-U_m(\theta)/k_B T] \sin(\theta) d\theta / Z \quad (3)$$

dengan Z fungsi partisi orientasi molekul mesogen bentuk batangan yang dinyatakan melalui integral

$$Z = \int_0^{\pi/2} \exp[-U_m(\theta) / k_B T] \sin(\theta) d\theta \quad (4)$$

dengan k_B tetapan Boltzmann dan T suhu Kelvin. Batas integrasi diambil 0 sampai $\pi/2$ karena molekul mesogen tidak terdiri dari gugus kepala dan ekor yang berbeda sehingga $\sin(\theta) = -\sin(\pi - \theta)$.

Karena volum pencampuran kecil maka perubahan volum cairan/lelehan dapat diabaikan, sehingga energi bebas Gibbs (G) dapat dianggap sama dengan energi bebas Helmholtz (A). Pada kesetimbangan fasa isotropik dan nematik berlaku kondisi

$$\mu_{1,I} = \mu_{1,N} \quad \text{dan} \quad \mu_{2,I} = \mu_{2,N} \quad (5)$$

dengan subskrip 1 dan 2 menyatakan berturut-turut molekul-molekul mesogen dan nonmesogen, dan I dan N menyatakan berturut-turut fasa-fasa Isotropik dan Nematik. Melalui hubungan termodinamik antara fungsi partisi Z dan fungsi Helmholtz A , dapat dituliskan persamaan (6 dan 7) berikut

$$\ln(1 - x_I) = \ln(1 - x_N) - [\varepsilon / 2k_B T] (x_N P_{2,N}')^2 \quad (6)$$

$$\ln x_I = \ln x_N - [\varepsilon / 2k_B T] (x_N P_{2,N}')^2 - \ln Z_N \quad (7)$$

Kedua persamaan terakhir pada keadaan "semu" setimbang akan memberikan syarat

$$\ln [1 + x_N(1/Z_N - 1)] = [\varepsilon / 2k_B T] (x_N P_{2,N}')^2 \quad (8)$$

Dengan menyelesaikan persamaan serentak tak-linier (3 dan 8) bagi $P_{2,N}'$ dan x_N , dan menyulih kedua besaran terakhir ke dalam Pers. (6 dan 7) dapat diperoleh x_I . x_I dan x_N kemudian dapat dialurkan dalam suatu diagram fasa (Gamb. 6).

3. Hasil dan Pembahasan

Diagram fasa hasil percobaan yang dilaporkan oleh Mochida dan Korai [6] dan diagram fasa hasil kalkulasi berdasarkan Teori Medan Molekular Kristal Cair oleh Shishido *dkk.*[7] diberikan pada Gamb. 7. Karena diagram fasa hasil eksperimen dinyatakan sebagai fraksi berat dari fraksi tak-larut benzena di dalam gegala mesofasa, maka secara perhitungan telah diasumsikan bahwa berat molekul dari fraksi larut benzena dan fraksi tak-larut benzena adalah identik.

Pada perbandingan diagram fasa hasil percobaan dan hasil kalkulasi pada Gamb. 7, yang nampak bahwa di antara kedua garis peralihan fasa yang dimulai dari sekitar 720 K pada 100%-brt fraksi tak-larut benzena, fasa nematik dan fasa isotropik berada bersama-sama dalam kesetimbangan semu. Meskipun hasil perhitungan memperlihatkan kecenderungan yang mirip dengan kecenderungan yang diamati pada perilaku peralihan fasa gegala mesofasa ini, nampak penyimpangannya masih cukup besar. Pada suhu yang sama, komposisi dapat menyimpang hingga 30%-brt (perbedaan hampir 100%), sementara pada komposisi yang sama, suhu dapat meleset sampai 130 K (perbedaan lebih dari 20%).

4. Catatan Penutup dan Saran-saran

Dari kajian yang dilakukan dan dilaporkan pada makalah ini, dapat disimpulkan bahwa:

Meskipun perlakuan secara pendekatan Teori Medan Molekular dari campuran mesogen-nonmesogen dapat sedikit banyak dipakai untuk menjelaskan diagram fasa dari gegala mesofasa, namun pendekatan ini masih memerlukan banyak pengetahuan anggapan-

anggapan yang telah diambil secara longgar di dalam kalkulasi.

Beberapa anggapan yang ditarik secara longgar dan perlu pengetatan antara lain:

Andaian molekul bentuk batangan sangat berbeda dari kenyataan yang dihadapi pada mesofasa karbon di mana molekul berbentuk lempengan/cakram diskotik.

Mengingat molekul cakram orientasinya dapat dinyatakan oleh arah vektor satuan tegak lurus bidang molekularnya, maka sudut θ tidak diukur terhadap sumbu panjang molekul lagi, melainkan terhadap vektor satuan arah molekul.

Dalam sistem mesofasa karbon hampir tak pernah dijumpai molekul sferis, melainkan nonmesogen berupa molekul aromatik berat molekul rendah ataupun molekul alisiklik berat molekul rendah.

Anggapan bahwa gejala mesofasa hanya merupakan campuran biner dari mesogen dan mesogen perlu diperketat dengan adanya komponen ketiga yang senantiasa berreaksi secara kimia dan beralih dari nonmesogen ke mesogen.

Mengingat sistem mesofasa karbon yang jauh dari kondisi ideal (sangat interaktif) maka anggapan bahwa energi bebas Gibbs identik dengan energi bebas Helmholtz perlu dikritisi. Konsekuensi dari kegagalan asumsi ini mengakibatkan bahwa Pers. (6 dan 7) harus dirombak.

Asumsi keadaan setimbang pada sistem gejala mesofasa yang kenyataannya senantiasa reaktif hingga akhir pembentukan kokas, perlu diperbaiki dengan faktor kereaktifan kimia dalam komputasi yang lebih kaku lagi.

Asumsi bahwa berat molekul fraksi larut benzena yang identik dengan fraksi yang tak-larut benzena, adalah sangat tidak benar, mengingat cincin aromatik terkondensasi pada molekul mesofasa yang tak-larut benzena dapat berjumlah puluhan kali lebih banyak dari pada jumlah cincin terkondensasi dari molekul fraksi larut benzena. Data GPC pada kedua fraksi ini yang banyak dijumpai di literatur dapat dirujuk [10].

Secara mendasar anggapan bahwa pada kesetimbangan fasa seluruh komponen di kedua fasa adalah sama, agak kurang tepat mengingat

sebagaimana telah disebutkan di depan bahwa sistem gejala mesofasa adalah sistem yang cukup reaktif pada suhu lunak hingga lelehnya.

Terakhir, sebagai pembanding yang shahih diperlukan diagram fasa sistem mesofasa karbon hasil eksperimen yang pengukurannya lebih akurat dan presisi. Kebanyakan diagram fasa yang dilaporkan di literatur, termasuk dari Mochida dan Korai [6] adalah hasil mikroskopi cahaya terpolarisasi, yang hasilnya sangat mengandalkan pada citra hasil refleksi permukaan, bukan mewakili fasa utuh (ruah)nya.

Berbagai faktor perbaikan terhadap berbagai asumsi dalam perhitungan teoritik sebagaimana tersebut di atas, tengah diimplementasi dalam pekerjaan pemodelan komputasional yang tengah ditangani dalam kelompok penulis. Hasil implementasi diharapkan akan dapat dipublikasikan mendatang, pada kesempatan event maupun media ilmiah yang lain.

Daftar Lambang

G	energi bebas Gibbs
A	energi bebas Helmholtz
k_B	tetapan Boltzmann
P_2	fungsi Legendre jenis kedua
P_2'	parameter keteraturan orientasi
T	suhu Kelvin
T_{NI}	suhu peralihan nematik-isotropik
$U_m(\theta)$	potensial anisotropik semu
x	fraksi mol mesogen
Z	fungsi partisi orientasi
ϵ	parameter energi
μ	potensial kimia

5.Ucapan Terimakasih

Penulis berterimakasih kepada para mahasiswa bimbingan tugas akhir dalam Kelompok Material Karbon & Grafit yaitu Sdr.Gunawan,SSi. yang telah menyiapkan ter dan mengkarakterisasi gejala dari batubara Bukit Asam dan Sdr.Wildan Usman Mihadja,SSi. yang telah mengkonversi dan mengkarakterisasi gejala residu minyak bumi Ashland Aerocarb-240.

Bambang Ariwahjoedi

6. Daftar Pustaka

1. J.D. Brooks & G.H. Taylor, *Nature*, vol. **697**, hal. 206 (1965)
2. B. Ariwahjoedi, *Tesis PhD.*, Universitas Sheffield, UK, hal. 264 (1991).
3. B. Ariwahjoedi & B. Rand, di dalam Ext. Abstr. 19th Bienn. Conf. on Carbon, Amer. Carbon Soc., The Penn. State Univ., Univ. Park, USA, June 25-30, (1989).
4. B. Ariwahjoedi & B. Rand, di dalam Ext. Abstr. Carbone '90, International Carbon Conference, Groupe Francais D'Etude Des Carbones, Paris, France, July 16-20, (1990).
5. R.J. Diefendorf, di dalam Ext. Abstract. 16th Bienn. Conf. on Carbon, hal. 26, (1983).
6. I. Mochida & Y. Korai, *J. Fuel Soc. Jap.*, vol. **64**, hal. 796, (1985).
7. M. Shishido, H. Inomata, K. Arai & S. Saito, *Carbon*, vol. **35** [6], hal. 797, (1997).
8. R.L. Humphries & G.R. Luckhurst, *Proc. Roy. Soc. Lond. A.*, vol. **352**, hal. 41, (1976).
9. R. Hurt, G. Krammer, G. Crawford, K. Jian & C. Rulison, *Chem. Mater.*, Vol. **14**, hal. 4558, (2002).
10. W.C. Stevens & R.J. Diefendorf, di dalam Carbon '86, International Conference on Carbon, Deuts. Keram. Gess. E.V., Baden-baden, 30 June-4 July 1986, hal.199, (1986).

Keterangan Gambar-gambar:

Gambar 1. Representasi skematik dari susunan molekul dalam gejala mesofasa

karbon [dari J.E. Zimmer & J.L. White , *Adv. Liq. Cryst.* vol. **5** hal. 157, (1982)]

Gambar 2. (A) Mikrograf cahaya terpolarisasi yang menunjukkan perkembangan pembentukan mesofasa karbon selama pirolisis fasa cair gegala antara 400 hingga 500°C [dari G. Savage, *Carbon-Carbon Composites*, Chapman & Hall, London, hal.169, (1993) (B) Dua macam simetri kristal pada sferula mesofasa karbon [dari Acuan (9)].

Gambar 3. (A dan B) Anisotropi pada koaservat lio/hidrotropik dan (C) Skema pembentukan tetesan nematik pada mesofasa karbon ternitrasi/tersulfonasi (D) Pengaruh perputaran tatakan sampel mikroskop terhadap pola salip Maltese [dari Acuan (2)].

Gambar 4. Diagram fasa sistem mesogen dan non-mesogen dengan (A) struktur molekul yang mirip (B) struktur molekul yang berbeda [dari Acuan (5)]

Gambar 5. Konfigurasi molekul mesogen terhadap sumbu optik dari mesofasa kristal cair.

Gambar 6. Skema tipikal diagram fasa gegala mesofasa karbon.

Gambar 7. Perbandingan diagram fasa hasil kalkulasi teoritis dengan diagram fasa hasil percobaan [dari Acuan (7)].

Studi Kimia Kuantum Tahap Awal Pirolisis TNTA Menggunakan (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida Sebagai Model

Muhamad A. Martoprawiro dan Nurul Irian Putra

Departemen Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132, Indonesia
muhamad@chem.itb.ac.id

Abstrak

Senyawa TNTA (1,3,5-triazido-2,4,6-trinitrobenzena) merupakan salah satu material yang bersifat sangat eksplosif. Reaksi penguraiannya berlangsung sangat cepat dan menghasilkan produk akhir berupa karbon monoksida (CO) dan nitrogen (N₂). Telah dilakukan studi kimia kuantum terhadap mekanisme reaksi pirolisis (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida yang digunakan sebagai model reaksi pirolisis TNTA. Salah satu tahap awal reaksi berupa pembentukan struktur lingkaran lewat pelepasan N₂. Optimasi geometri, serta perhitungan frekuensi dan energi dilakukan awalnya pada tingkat teori Hartree-Fock (HF) dan Becke3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) dengan menggunakan himpunan basis 6-31G(d), dan dilanjutkan dengan tingkat teori yang lebih tinggi. Untuk tahap pembentukan lingkaran dan N₂, digunakan hipotesis dua macam mekanisme reaksi, yaitu reaksi pertahap, yang melibatkan dua keadaan transisi (TS1 dan TS2) dan satu senyawa antara *cis-II*, dan reaksi serempak, yang hanya melibatkan satu keadaan transisi TS3. TS1 dan TS3 berhasil diperoleh pada keadaan singlet, sedangkan TS2 dan *cis-II* berhasil diperoleh pada keadaan triplet. Perhitungan tetapan laju (*k*) tahap tersebut menghasilkan nilai sekitar $18 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Penggunaan 2-nitrofenil azida dipilih untuk melihat pengaruh lingkaran aromatik terhadap reaksi yang terjadi. Seperti telah diduga, walaupun diamati adanya pengaruh aromatik, tetapi pengaruhnya tidak terlalu besar terhadap mekanisme reaksi, karena gugus samping yang terlibat dalam reaksi amatlah reaktif. Kajian awal tahap-tahap selanjutnya pada mekanisme reaksi pirolisis TNTA setelah pembentukan lingkaran benzofuroksan telah pula dilakukan melalui kedua molekul di atas sebagai model.

Kata Kunci : TNTA, (Z)-1-azido-2-nitroetena, 2-nitrofenil azida, ab initio, pirolisis

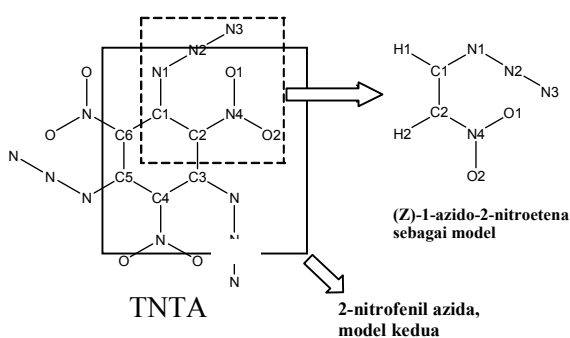
1. Pendahuluan

TNTA (1,3,5-triazido-2,4,6-trinitrobenzena) dikenal sebagai senyawa yang bersifat mudah meledak, lebih dari TNT (2,4,6-trinitrotoluena). Penelitian ini mencoba memodelkan reaksi pirolisis molekul TNTA lewat molekul yang lebih sederhana, yang hanya mengandung satu gugus azida dan satu gugus nitro (TNTA mengandung tiga azida dan tiga nitro). Dua molekul yang dipilih adalah (Z)-1-azido-2-nitroetena dan 2-nitrofenil azida, dimana kedua gugus itu (azida dan nitro) terikat pada berturut-turut molekul etana dan benzena. Pada etana, tentunya terjadi pengabaian pengaruh lingkaran aromatik terhadap kedua gugus, sedangkan molekul kedua dipilih untuk melihat seberapa besar pengaruh lingkaran aromatik.

Molekul model yang kedua, yaitu 2-nitrofenil azida, sebelum ini sudah dikaji reaksi pirolisisnya secara kuantum (Rauhut, 1999), tetapi belum meninjau tahap reaksi pembukaan lingkaran. Pengkajian yang dilakukan baru mencakup apa yang dapat terjadi pada kedua gugus (azida dan nitro) tanpa melihat bagaimana potensi pengaruh kedua gugus itu pada pemecahan ikatan C-C aromatik.

2. Metode Komputasi

Dalam tahap awal eksplorasi mekanisme pirolisis TNTA ini, geometri dan frekuensi vibrasi untuk berbagai spesi kimia dihitung dengan menggunakan metode Hartree-Fock, dengan himpunan basis 6-31G(d). Pendekatan perhitungan Hartree-Fock yang digunakan sebagian



Gambar 1 Molekul TNTA dan kedua modelnya. Model pertama ditandai oleh garis putus-putus, model kedua garis tegas.

besar spesi stabil menggunakan pendekatan untuk sistem kulit-tertutup dari Roothaan dan Hall (Roothaan, 1951). Khusus tahap pertama pirolisis yang dibahas di sini, digunakan juga pendekatan teori fungsi kerapatan (DFT) dari Becke (dengan 3 parameter) dengan fungsi korelasi dari Lee-Yang-Parr (B3LYP) (Kohn, 1996). Kemudian, perhitungan energi MP2 satu titik dilakukan untuk struktur setimbang dan keadaan transisi.

Perhitungan koreksi termal terhadap energi dan entalpi molekul pada suhu tertentu dilakukan dengan rumus baku mekanika statistik untuk osilator harmonik kuantum dan rotor klasik, juga translasi klasik (McQuarrie, 1973). Dengan menggunakan hasil perhitungan ketinggian hambatan energi dan fungsi partisi molekul, parameter Arrhenius untuk tahap reaksi elementer ditentukan dengan menggunakan Teori Keadaan Transisi, yang prinsip dan rinciannya telah dibahas pada makalah saya sebelum ini (Bacskey, 1998).

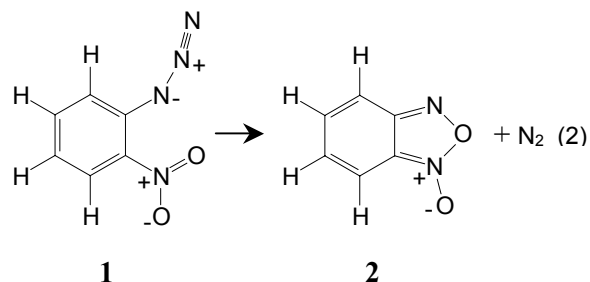
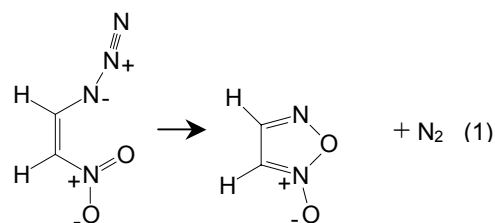
Perhitungan kimia kuantum dilakukan dengan program Gaussian98 (Frisch, 1998) maupun beberapa program lain untuk perbandingan, yaitu Dalton (Helgaker, 1997) dan MPQC (*Massive Parallel Quantum Chemistry*), pada komputer server berbasis pemroses ganda Intel Pentium III 800 MHz, di samping komputer dengan pemroses tunggal Intel Pentium IV 3,2 GHz..

3. Hasil dan Pembahasan

Sebelum ini, telah dilakukan perbandingan parameter struktur TNTA dan model pertama ((Z)-1-azido-2-nitroetena) pada tingkat teori Hartree-Fock, dan penentuan tahap-tahap elementer yang tidak melibatkan pembukaan lingkaran dengan menggunakan model tersebut

(Putra, 2004). Perbandingan parameter struktur (panjang ikatan, sudut ikatan) menunjukkan kemiripan yang tinggi antara TNTA dan model, kecuali pada panjang ikatan C–C. Untuk yang terakhir, tentu perbedaannya amat bisa difahami. Ditemukan bahwa model kedua menunjukkan kemiripan struktur yang lebih baik dengan TNTA¹. Selain itu, penambahan model kedua (2-nitrofenil azida) pada penelitian ini memungkinkan kita untuk melihat besarnya pengaruh aromatik terhadap mekanisme reaksi samping, serta pengkajian tahap-tahap pembukaan lingkaran karbon.

Pada tahap awal, terjadi pelepasan N₂, diikuti pembentukan lingkaran furoksan akibat interaksi antara atom N yang tertinggal dengan gugus nitro.



Reaksi 1 dihipotesiskan dapat melalui dua mekanisme, yaitu pertahap dan serempak (Putra, 2004). Reaksi pertahap berlangsung lewat reaksi elementar pelepasan N₂ dari gugus azida diikuti tahap berikutnya berupa pembentukan lingkaran furoksan. Mekanisme ini melalui dua struktur keadaan transisi (TS1 dan TS2), yang berhasil ditemukan geometri dan energinya, di samping struktur spesi antara *cis*-II. Reaksi serempak merupakan reaksi pelepasan N₂ yang berlangsung secara serentak dengan pembentukan lingkaran furoksan, melewati *satu* struktur keadaan transisi TS3. Rauhut dan Eckert, yang mengkaji reaksi (2), menduga bahwa penemuan TS1 dan TS2 merupakan suatu kesalahan, karena kelemahan teori Hartree-Fock yang ku-

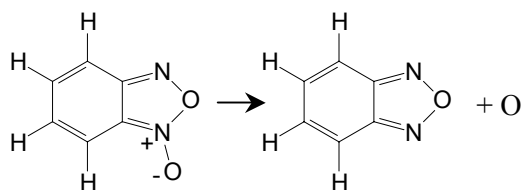
¹ Data parameter struktur yang lebih lengkap dapat dilihat pada halaman pendukung.

rang memperhatikan korelasi elektron. Mereka lebih mempercayai mekanisme serempak daripada mekanisme pertahap.

Diperlukan perhitungan pada tingkat teori yang lebih tinggi yang lebih memperhatikan korelasi elektron untuk memastikan kebenaran klaim ini, yang sementara ini tidak dilakukan dalam penelitian ini. Penelitian ini lebih banyak mencoba menemukan tahap-tahap lanjutan dari tahap awal di atas. Untuk tahap pelepasan N₂ dan pembentukan lingkaran, untuk sementara digunakan hipotesis Rauhut dan Eckert (Rauhut, 1999).

Dengan asumsi struktur planar, perhitungan frekuensi molekul yang terlibat pada reaksi (2) menunjukkan seluruh frekuensi positif untuk hasil reaksi benzofuroksan, tetapi ditemukan satu frekuensi imajiner dengan nilai yang amat kecil pada pereaksi. Hal ini menunjukkan bahwa struktur paling stabil untuk hasil reaksi benzofuroksan memang datar, tetapi kehadiran frekuensi imajiner pada 2-nitrofenil azida menunjukkan strukturnya yang seharusnya tidak datar, dan bukan menunjukkan ditemukannya suatu struktur keadaan transisi. Karena nilai frekuensinya yang amat kecil, penyimpangan dari struktur datar amatlah kecil, yang mungkin terjadi pada gugus nitro akibat faktor sterik tolakan antar kedua gugus, azida dan nitro. Sebagai pendekatan, kita menggunakan energi struktur datar untuk perhitungan perubahan entalpi reaksi. Perhitungan Rauhut dan Eckert pada tingkat teori yang berbeda menghasilkan selisih hanya 0,2 kkal/mol antara struktur terstabilnya dengan struktur datar. Kita tidak melakukan pengecekan lebih jauh dalam hal ini.

Tantangan berikutnya adalah menemukan mekanisme pembukaan lingkaran yang membutuhkan energi terendah, dari berbagai tahap yang mungkin. Pengkajian tahap ini tidak dapat menggunakan model pertama melainkan model kedua. Tetapi, satu tahap sebelumnya yang kurang endoterm adalah pelepasan atom oksigen oleh benzofuroksan untuk menghasilkan benzofurazan.

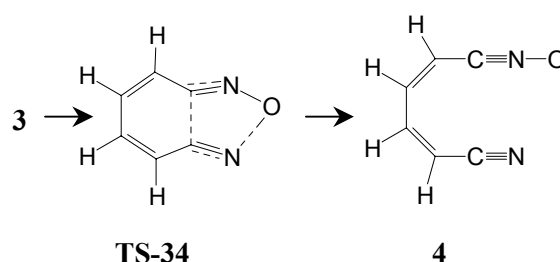


2

3

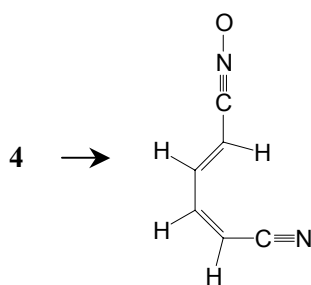
Perhitungan menunjukkan struktur yang datar untuk kedua molekul di atas, yang data rincian-nya dapat dilihat di halaman pendukung. Tidak ditemukan keadaan transisi di antara pereaksi dan hasil reaksi, yang menunjukkan sifat tahap reaksi ini yang energinya menaik tanpa melalui suatu puncak energi keadaan transisi.

Dari berbagai tahap pembukaan lingkaran karbon yang mungkin, ditemukan tahap yang hambatannya paling kecil yaitu yang melibatkan pembukaan secara serempak kedua lingkaran dalam molekul. Berikut reaksinya dari benzofurazan melalui struktur keadaan transisinya, TS34.



Pada tingkat teori Hartree-Fock, energi pengaktifan reaksi pembukaan lingkaran karbon ini sekitar 330 kJ/mol. Walaupun cukup besar, tapi masih dalam orde yang sama bahkan lebih kecil dari energi pemutusan ikatan C-H, dan sejauh ini ditemukan lebih kecil dibanding pembukaan lingkaran dengan cara yang lain. Perubahan entalpi reaksinya sekitar 150 kJ/mol, jadi reaksi pembukaan dua lingkaran ini melalui suatu hambatan energi.

Hipotesis tahap elementer berikutnya yang dianggap secara energetika paling mudah adalah pelepasan molekul HCN atau HCNO. Pada pelepasan HCNO, diperkirakan perlu isomerisasi *cis-trans* sebelum terjadi pemutusan ikatan. Isomer *trans* lebih mudah mencapai suatu keadaan transisi yang menyiapkan terbentuknya molekul HCNO dengan atom H terdekat. Dari perhitungan di tingkat teori Hartree-Fock, perubahan energi yang terjadi pada pelepasan HCNO sekitar 170 kJ/mol, tetapi isomerisasi *cis-trans* harus melewati hambatan energi di atas 350 kJ/mol.



Pada penelitian lain dinyatakan bahwa reaksi yang melibatkan ikatan antara atom nitrogen dan oksigen memerlukan tingkat teori yang lebih tinggi untuk tingkat ketepatan perhitungan tertentu dibandingkan dengan ikatan-ikatan antara atom-atom yang kurang elektronegatif seperti karbon, hidrogen, dll. (Stevens, 2001). Karena itu, hasil-hasil perhitungan dalam penelitian ini harus dianggap sebagai awal dari perhitungan yang lebih akurat, yang bisa diandalkan untuk perhitungan lanjutan, misalnya pemodelan kinetik pada peramalan komposisi hasil reaksi pada suhu tertentu, jika seluruh tahap reaksi pirolisis sederhana diramalkan dengan baik.

4. Kesimpulan

Perhitungan *ab initio* menunjukkan bahwa pirolisis TNTA dapat dimulai dengan pelepasan gas nitrogen yang sekaligus diikuti pembentukan lingkaran furoksan. Pembukaan lingkaran benzena pada dasarnya relatif sulit. Pada model 2-nitrofenil azida, dari berbagai kemungkinan pembukaan lingkaran benzena, satu yang termudah adalah dengan pemutusan ikatan C-C di antara atom karbon yang berturut-turut mengikat gugus azida dan gugus nitro, setelah sebelumnya terjadi pembentukan lingkaran furoksan. Hal ini dapat menjelaskan mengapa TNTA mudah meledak, yaitu karena pada molekul tersebut, setiap pasang ikatan C-C pada lingkaran benzenanya memiliki potensi untuk mengikuti mekanisme pembukaan lingkaran tersebut, yang didorong pula oleh adanya tegangan sterik di antara keenam gugus pada lingkaran benzena. Selain pelepasan N₂, mekanisme pemecahan molekul menjadi fragmen yang lebih kecil dapat terjadi lewat isomerisasi *cis-trans* yang diikuti oleh pelepasan molekul HCN atau HCNO.

Untuk menemukan energi pengaktifan dan perubahan entalpi yang lebih akurat, akan dilakukan perhitungan pada tingkat teori yang

lebih tinggi yang lebih memperhatikan pengaruh korelasi elektron, seperti Moller-Plesset orde ke-4, CASSCF atau G2(MP2), serta himpunan basis yang lebih baik. Hal ini juga akan membantu memilih secara lebih pasti tahap yang lebih disukai ketika dilakukan eksplorasi mekanisme reaksi pirolisis TNTA yang lebih menyeluruh. Tantangan berikutnya adalah melihat seberapa besar perbedaan kemudahan bereaksinya TNTA dalam sistem tanpa oksigen dan dengan kehadiran oksigen.

5. Informasi Pendukung

Struktur dan data lain yang lebih terinci untuk setiap spesi kimia yang terlibat dalam reaksi di atas akan disimpan pada halaman pendukung di <http://research.chem.itb.ac.id/theocomp>.

6. Daftar Pustaka

- Bacskey, G. B., Martoprawiro, M., Mackie, J. C., 1998, *Chem. Phys. Lett.*, **290**, 391-398.
- Frisch, M. J., *et al*, 1998, Gaussian 98, Revision A.7., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA.
- Helgaker, T., Jensen, H. J. Aa., Joergensen, P., Olsen, J., Ruud, K., Aagren, H., Andersen, T., Bak, K. L., Bakken, V., Christiansen, O., Dahle, P., Dalskov, E. K., Enevoldsen, T., Fernandez, B., Heiberg, H., Hettema, H., Jonsson, D., Kirpekar, S., Kobayashi, R., Koch, H., Mikkelsen, K. V., Norman, P., Packer, M. J., Saue, T., Taylor, P. R. and Vahtras, O., 1997, DALTON: an *ab initio* electronic structure program, Release 1.0
- Kohn, W, Becke, A.D., Parr, R.G., 1996, Density functional theory of electronic structures, *J. Chem. Phys.*, **100**, 12974-12980.
- McQuarrie, D. A., 1973, *Statistical Mechanics*, Harper & Row, New York, 129.
- Putra, N. I., 2004, Dekomposisi termal TNTA: menggunakan (Z)-1-azido-2-nitroetana untuk memodelkan tahap awal dekomposisi, Skripsi Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Rauhut, G. dan Eckert, F., 1999, A Computational study on the mechanism and kinetics of the pyrolysis of 2-nitrophenyl azide, *J. Phys. Chem. A*, **103**, 9086-9092.
- Roothaan, C.C.J., 1951, New developments in molecular orbital theory, *Rev. Mod. Phys.*, **23**, 69-89.
- Stevens, J., Schweizer, M., Rauhut, G., 2001, Towards an understanding of the furoxan-dinitrosoethylene equilibrium, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7326-7333.

INDEX PENGARANG

A. A.Istri Ratnadewi	1	Aziz Deraman	94, 158
A. B. Sulaiman	962	Azman Sulaiman	1044
A. Herry Cahyana	60	B. Anwar	402
A. I. Mohd. Hasrol	1007	B. Ariwahjoedi	756
A. Latiff	18, 25, 444, 467, 522	B. Kuswandi	178
A. Manaf Ali	1007	B. Machbub	320
A. Netty Siahaya	10	B. Tanajaya	402
A. Ramli	217	B. V. E. Viera	164
A. S. Noer	11, 1028	Badrul Munir Md-Zain	165, 1044
A. Wiryawan	374	Bahaa-eldin Elwali A.Rahim	170
A.A Gani	178	Baharuddin Abdullah	619
A.H. Hashim	807	Bahrudin Saad	191, 263, 641
A.L.N. Aminin	100	Bakhendri. S	642
A.Suharto	86	Bambang Ariwahjoedi	71, 177, 223
Abd. Aziz	728	Bambang Setiaji	185
Abd. Munir Abd. Murad	302	Basuky S	549
Abdul Ghani Rafek	170	Bohari M. Yamin	81, 192, 259, 263, 298, 350, 641, 711, 714, 728, 739, 813, 1007, 1049
Abdul Hamid Othman	393, 1007	Bong Pei Thing	196
Abdul Hamid	724	Buchari	110, 666, 902
Abdul Jalil Abdul Kader	12	Budiasih Wahyuntari	864
Abdul Muis	912	Budiawan	199
Abdul Rahim Samsudin	976	Ch ng Soo E	1080
Abdul Rahim Yacob	27	C. Ciptati	216
Abdul Razak Daud	34, 42	C.L. Radiman	209, 402, 574, 604
Abdul Salam Babji	46, 53, 504, 1080	Chairul	521
Abdul Wahab Mohammad	558	Chen Kee Cheong	453
Abdussalam Salhin	263	Chin Siok Fong	985
Achmad Rochliadi	64, 71	Chung Pei Yin	589
Adi Pramono	150	Cuk Imawan	478
Afnidar	79	D. I. Lestari	374
Afzana Anum Ahmad Anuar	117	D. R. Abu Bakar	217
Agus Abhi Purwoko	80	D. Umaningrum	374
Agustono	912	D.C. Paul	496
Ahamad Abu	191	Dadan S	132
Ahamad Sahali Mardi	81	Dahlia Safa Marwati	94
Aidil Abd Hamid	155	Dahyunir Dahlan	42
Akhmaloka	86, 100, 164, 309, 375, 514, 692, 761, 849, 1020, 1090	Dai	766, 908
Alan Tunnacliffe	527	Darmiwati, R	467
Alfinda Novi Kristanti	94, 387, 678	Dawn Carmel Paul	12
Aminah Abdullah	106, 589, 790	Deana Wahyuningrum	223
Aminuddin Abdul Karim	985	Deasyana Mihardja	231
Aminudin Sulaeman	110	Dessy Natalia	237
Amran Ab.Majjid	117, 653, 787	Dewi Apriliani	864
Amril Latif	123	Dian Iramani	328
Anas Subarnas	280, 912	Dicky	549
Ani Mulyasuryani	137, 373	Dini Faradila	991
Anik Sunarni	328	Dini Zakiah Fathiana	241
Anna Permanasari	132	Djulia Onggo	241, 298, 439, 813, 1043
Anwar Mustafa	380	E. Agustina	178
Arba'at Hassan	141	E. Asijati	178
Asep Supriatna	150	E. Sulistyono	374
Ashraf Jaradat	158	E. Susanti	86
Ayub Mohd Yatim	155	Elhadi Elbay Saad	1007
Azian Abdul Latiff	985	Eli Rohaeti	1085
		Elizabeth A. H. Hall	527

Emelia. O	431	Hidayah Sahar	117
Emilio L	1000	Hideo Hayashi	912
Endang Asijati Ichsan	245, 921	Hitoshi Watarai	1023
Endang S. Atimah	1028	Ho, C.W	953
Endang Saepudin	253	Hokcu S	132
Endom Ismail	259, 769	Huang Nay Ming	617
Engku Norbaya Muda	854	I Wayan Dasna	893
Eny Kusriani	263, 641	I Wayan Muderawan	409
Erlin Nurtiyani	889	I Wayan Suja	409
		I. Ahmad	217
Euis H. Hakim ³⁴⁵ ,	357, 449, 467, 508, 534,	I. M. Arcana	402, 574
	672, 696, 720, 735, 744, 779, 818, 841, 878,	I. M. Said	18
	982, 1000	I.N. Tika	86, 1090
Euis Julaeha	280	Ibrahim Abdullah	415, 419, 713
Evi Susanti	283, 306	Ibrahim Baba	241, 393, 439, 728, 1007
F. Madayanti	86, 100, 164, 231, 309, 375,	Ibrahim Komo	424
	514, 761, 1020	Ibrahim N.Hasan	711
F.A. Asmuruf	289	Ida I	132
Fadhli Hadana Rahman	293	Idris, A.B	431
Fahimah Martak	298	Iis Siti Jahro	439
Faika Dwiyantri	883	Ijan Khushaida M. Jan	619
Farah Diba Abu Bakar	302	Ikenna Alphonse Osi	191
Farah N	1080	Ikram M. Said	1000
Fariati	283, 306	Ikram M. Said	357, 444, 449, 508, 522, 672,
Fasade Miharja Beangi	1057		724, 744, 779, 818, 878, 1000
Fauziah Hanim Shaarani	302	Indra Noviandri	401, 666, 902
Firman AP	314	Intan Asri	991
Francis Wong	687	Iqbal Musthapa	449
Francisca N. Liman	401	Ishak Ahmad	453
Gapor, M.T	691	Ismail A Rahman	548, 641
Gatot Trimulyadi R	328	Ismail B. S	459
Gede Wibawa	333, 567	Ismail Bahari	640
Geri Gopir	487	Ismunandar	439, 463, 540, 813, 1043
Ghisalberti	1000	Isn Marlianti	328
H. Helwati	86	Isnida, I	691
H. Pramono	86	J. Kader	496
H. Yohandini	375	J.J. Mohamed	807
Habibah HJ Jamil	338	Jalifah L	
Hafizan Juahir	619	Jalifah L	Jalifah Latif
Hairul, M	467		
Halimah Muhammad	459	Jalifah Latip	357, 467, 508, 597, 672, 720
Hanapi Usman	345		724, 779, 818, 841, 854, 878, 982, 1000
Hanis bt Mohd Yusoff	27	Jamaluddin Mohd. Daud	471
Hapipah Mohd Ali	259, 350, 769	Jarnuzi Gunlazuardi	477, 478
Harry Kurniawan	945	Jatmika Setiawan	415
Hary	549	Johari Ibahim	985
Haryoto Saroyobudiyono	357	Joseph JL	823
Hasnah M. Sirat	361	Jumaat Hj. Adam	487
Hasnah Muin	368	Jumat Salimon	487, 492, 801
Hasrina, H	467	K. Nadarajah	496
Hayat Sholihin	150	K. ORIHARA	289
Hedi Surahman	477	K. Weisz	550
Hefill Hardiman	463	Kadariah	328
Hendyk Krisna Dani	373	Kalaivani Nadarajah	12
Hens Saputra	380	Khairul Amdani	859
Herman, S	642	Khairul Asmak Abd. Kadir	492
Hermin Sulistyarti	374	Khairul Faizal Pa'ee	504
Hery Suwito	387, 678	Khiew Poh Sim	617
Hesti Lina	309	Kholifatu Rosyidah	508

Khuzaimah	293	Merlyn Surja	1028
Kosela, S	766, 908	Mimin A	298
Krohn, K	766, 908	Mohamad MD Tan	338
Kuniyoshi Shimizu	917	Mohamed Noor Hasan	580
Kuswandi	567	Mohamed Rozali Othman	801
L. Ambarsari	86, 514	Mohammad Alinor bin Abdul Kadir	618
L. B. Din	18, 158, 196, 444, 449, 508, 522 672, 724, 744, 779, 818, 841, 878, 1000	Mohammad B. Kassim	293, 739
L. B. S. Kardono	521	Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin	646
L.R. Sihasale	849	Mohd Khan Ayob	155
Laily B. Din	196	Mohd Rozali Othman	712
Lee Lay Meng	361	Mohd Sharizan Ahmad Shahrifun	155
Lee Yook Heng	79, 527, 687, 714, 796, 836	Mohd Wahid Samsudin	522
Lengga Priani	309	Mohd Yazid Ahmad	34
Leong, C.K	431	Mohd. Shuhaimi Othman	543
Lia D. Juliawaty	345, 449, 508, 672, 735, 744, 779, 818, 841, 878, 1000	Mohd.Khan Ayob	790
Lik Anah	583	Mohsen Nasirian	640
Lince Yarni	521	Muhamad Daud	34
Lindarti Purwaningsih	540	Muhamad A. Martoprawiro	636, 830, 1043
Lukman Makmur	345, 449, 508, 534, 672, 735, 744, 779, 818, 878	Muhamad Barzani Gasim	487
M Hasan Abadi	463	Muhamad Mat Salleh	659
M. A. Fulazzaky	320	Muhamad Samudi Yasir	117, 653, 787
M. Arif Batutah	567	Muhamat Syahroni	253
M. Asy'ari	100	Muhammad Ali Zulfikar	558
M. Ekhwan Toriman	619	Muhammad Barzani	543
M. Hasan	574	Muhammad I. Saleh	191, 263, 641
M. P. Widhiastuty	692	Muhammad Naqib	1
M. Sindumarta	1090	Muhammad Sum Hj Idris	683
M. Utoro Yahya	637	Muhammad Yahaya	659
M.A. Hamid	807	Muhayatun	1092
M.A. Nawati	551	Muhtadi	672
M.A. Sulfikar	402	Muji Harsini	666
M.Noor Jalaluddin	345	Mulyadi Tanjung	94, 387, 678
Md. Pauzi Abdullah	1091	Muntaz Abu Bakar	642, 683
M.R. Moeis	86, 514	Mursyidah	659
M.S. Shaari	807	Musa Ahmad	79, 527, 687, 796, 836
M.Z. Ibrahim	551	Musalmah Mazlan	691, 985
Mahani Mansor Clyde	165	N. ASANO	289
Mahdi Che Isa	34	N. M. Surdia	604, 756
Mahfud	583	N.S. Mulyani	100
Mahmiah	678	Naili Sofianingsih	583
Maimon Abdullah	589, 712	Nanik Fauziah	678
Maimunah Sokro	141	Nanik Nurcahyani	583
Mamik M Q	387	Nanik Siti Aminah	94, 678, 696
Mamot Said	597	Neni Frimayanti	580
Mansor Abdul Hamid	548	Ng Seik Weng	769, 1007
Margono	549	Ngai Mun Hong	361
Maria Goretti	550	Nik Idris Nik Yusof	196, 982
Mariko Katajima	345, 696	Nikmans Hattu	702
Marlia Mohd Hanafiah	487	Nizam Said	158
Marlina	604	Nobuo Tanaka	710
Masatake Niwa	696	Noerati	703
Maskat, M.Y	106, 953	Noor Aini Abdul Hamid	985
Masni Mohd Ali	609	Noor Azilah M Kasim	711
Mazlan Othman	642, 424	Noor Hapeedah M. A	467, 720
Mazlin B. Mokhtar	619	Noor Hasani Hashim	191
Md Soot Ahmad	617	Noorlela	60
		Noorshida Mohd Ali	714
		Nor Anisah Abdullah	53
		Nor Muhammad Mahadi	302

Norazam Hassan	53	Rusli Daik	293
Nordin Hj Lajis	350, 769	Russell F. Howe	1036
Norela Sulaiman	589, 712	Rustaman	830
Norhafipah, M	467	S. Achmad	604
Norhayati Abdullah	53	S. Ekawardhani	849
Norhayati Ali	191	S. H. Inayat-Hussain	1007
Norizan Ahmat	724	S. M. Monjurul Alam	962
Norlinda Daud	713	S. Nurbaiti	849
Normah Awang	728	S. Purwadaria	756
Norrakiah Abdullah Sani	46, 53, 504	S. Suryowidagdo	521
Norziah Mohd Hani	191	S. Wafiroh	209
Novi Christina	137	S.I. Rahayu	574
Nugrahaningsih	306	S.S.Chow	551
Nugroho,DA	766	Sadjah Achmad	223
Nur Huda Faujan	46	Saepurahman	1057
Nurakmal Othman	53	Sagir Alva	836
Nurlelasari	735	Sahibin Abd. Rahim	487
Nurul Fadhillah K. Aripin	350	Sahidin	841
Nurul Irian Putra	636	Salma, M.Y	106
Nurul Izza, N	1049	Salmijah Surif	589, 712
Nurul Qomariah	309	Saraswati	847
Nurul, A	766	Satirah Zainalabidin	854
Nurulhuda Edy Muslim	487	Scott Donne	935
Nuryatini	872, 1093	Seik Weng Ng	298, 350
Nurziana Ngah	739	Selvi, C	431
Nyoman S. Suastrri	744	Serly Jolanda Sekewael	848
Osman Hassan	155, 953	Setiaty Pandia	859
P. Aditiawati	100, 761	Shahani Shahar	589
P. Yatiman	756	Shahidan Radiman	42, 617
P.E. Susilowati	761	Shajarahtunnur Jamil	361
Paden Morat	854	Sharifuddin M. Zain	350, 619, 769
Parlan	893	Sheila Nathan	302
Patrick Perlmutter	216	Shigeo Tanaka	444
Pudjiastuti, P	766	Siswati Setiasih	60, 773, 864
Puvaneswary Subramaniam	769	Siti Aisyah	878
R. Flora Mariana	773	Siti Azma J	823
R. SATO	289	Siti Channah	945
R. Suratman	756	Siti Nadiyah Abdul Halim	350
R. Y. Perry Burhan	748	Sjamsul A. Achmad	345, 449, 508, 534, 696, 735, 672, 744, 779, 818, 841, 878, 982, 1000
R.J. Talib	807	Slamet	477
Rahmat Wibowo	478, 773	Soewarno T. Soekarto	790
Ramlan Omar	487	Soleh Kosela	871
Rani Maharani	779	Sri Hidayati	373
Rashdan MM	823	Sri Sudiono	185
Redzuwan Yahaya	653, 787	Sri Sumartini	872
Revan A	549	Sri Widarti	1102
Reza Brahma	223	Subandi	761
Rifa Rachmah	71	Sue Mian, T	691
Rita Hayati	790	Sufian Idris	158
Rita Sundari	79, 796	Suhana Samat	597
Riyanto	801	Sumardi	872
Rohana Adnan	263, 641	Sumi Hudyono	883
Rohasmizah Hashim	46	Supriyatna Sutardjo	280, 912
Roland De Marco	64	Sura Menda Ginting	185
Ros Kusuma Dewi	478	Suriah Abd Rahman	155
Rosdiana	813	Susanto Imam Rahayu	439, 666, 882, 902
Rossi M.T	60	Susilowati HS	883, 889
Rusdiyah Fatatik	818	Sutrisno	893
Ruslan Abdullah	823		

Suwarso, W.P	766, 908	Wan Zurinah Wan Ngah	985
Suwito, H	766, 908	Wawang Suratno	991
Suyanta	902	Widianingsih	646
Suyanto	908	Winda Puspitasari	245
Syafruddin	912	Winiati, S	908
Syahida Maarof	155	Wiwit Nurhayati	373
Takashi Kamiyama	911	Wong Pick Foon	712
Tan Choon Chek	543	Yana M. Syah	345, 357, 449, 467, 508, 534, 672, 696, 720, 735, 744, 779, 818, 841, 878, 982, 1000
Tan Y. A	459	Yang Farina	393, 728, 1007
Tati Herlina	912	Yanti Sabarinah Soebianto	245, 921
Tiaras Sinambela	917	Yanty Maryanty	1020
Tita Puspitasari	921	Yepy Hardi R	889
Tjodi Harlim	345	Yeun LH	823
Trismilah	864	Yip Foo Win	1007
Tukiran	917	Yoki Yulizar	1023
Ujang. S	642	Yoni F Syukriani	11, 1028
Umar A. Jenie	1110	Yudhi Utomo	306
Umar Hamzah	926	Yuni Fatisa	199
Umi Syafa'ah	917	Yuni K. Krisnandi	1036
Ummy Mardiana	110	Yusamsutin	94
Unang Supratman	280, 678, 912, 1118	Yusthinus T. Male	1043
Utami Sri Hastuti	283	Zackiyah	132
Vun Vui Fui	165, 1044	Zaenal Awaludin	478
Wahyu Budi Utomo	935	Zaidi M. Isa	1044
Wahyudi Priyono Suwarso	945	Zaihan Jalaludin	619
Wan Aida	106	Zainal-Abidin B.A.H	1049
Wan Aini Wan Ibrahim	962	Zakaria	985
Wan Fuad Wan Hassan	338, 970	Zalifah Latif	449, 744
Wan Jefri Basirun	350, 769	Zeily Nurachman	1057
Wan Mokhtar Wan Yusoff	155	Zuhrina Masyithah	1062
Wan Ngah, W.Z	691	Zulfikar	1
Wan Nor Azami Wan Omar	471	Zuriati Zakaria	522
Wan Ramli Wan Daud	293		
Wan Zuhairi Wan Yaacob	170, 976		
Wan Zuraida Wan Mohd. Zain	982		