

MIPA

LAPORAN PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL TAHUN ANGGARAN 2011

TEMA:
PERUBAHAN IKLIM DAN KERAGAMAN HAYATI



MODIFIKASI STRUKTUR VANILIN HASIL ISOLASI DARI BUAH VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews) DAN PENGEMBANGAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER

Oleh :
Sri Handayani, M.Si
Retno Arianingrum, M.Si
Dr. Winarto Haryadi

Dibiayai oleh DIPA Direktorat dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional sesuai dengan Surat Perjanjian penugasan dalam rangka Pelaksanaan program penelitian Strategis nasional tahun Anggaran 2011 Nomor 421/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 tanggal 11 April 2011

UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA
November 2011

LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL

1. Judul Penelitian : Modifikasi Struktur Vanilin Hasil Isolasi Dari Buah Vanili (*Vanilla Planifolia* Andrews) Dan Pengembangan Potensinya Sebagai Antioksidan Dan Antikanker
2. Ketua peneliti
- a. Nama lengkap : Sri Handayani, M.Si
 - b. Jabatan : Lektor Kepala
 - c. Jurusan : Pendidikan Kimia
 - d. Alamat surat : P Kimia FMIPA UNY, Karangmalang, Yogyakarta
 - e. Telepon rumah/kantor/HP : -/0274 586168/087878200458
 - f. Faksimili : -
 - g. E-mail : handayani137uny@yahoo.com
3. Tema Payung Penelitian : Perubahan iklim dan keragaman hayati
4. Skim Penelitian : LPPM
5. Program Strategis Nasional : Diversifikasi fungsi biodiversity
6. Bidang Keilmuan/Penelitian : Kimia Organik
7. Tim Peneliti :

No.	Nama dan Gelar	Bidang Keahlian
1.	Retno Arianingrum, M.Si	Biokimia
2.	Dr. Winarto Haryadi	Bioteknologi

8. Mahasiswa yang terlibat :

No.	Nama	NIM
1.	Anton Cahyono	

9. Lokasi Penelitian : Lab. Organik FMIPA UNY
10. Waktu Penelitian : 2 tahun
11. Dana yang diusulkan : Rp.117.500.000,-

Mengetahui
Dekan FMIPA

Yogyakarta, 13 November 2011
Ketua TIM Peneliti

Dr. Hartono
NIP.196203291987021002

Sri Handayani, M.Si
NIP.19700713 1997022001

Mengetahui
Ketua LPPM

Prof. Sukardi, PhD
NIP. 195905191978111001

RINGKASAN

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa turunan benzalaseton benzalasetofenon terbukti aktif sebagai antioksidan sehingga diharapkan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai senyawa kandidat antikanker. Turunan ini dapat disintesis dari vanilin yang termasuk sebagai salah satu turunan benzaldehida. Vanilin banyak terdapat dalam buah vanili yang melimpah di Indonesia tapi belum banyak diolah lebih lanjut. Tujuan penelitian ini adalah modifikasi struktur vanilin hasil isolasi dari buah vanili pada penelitian tahun pertama menjadi vanilinasetofenon dan divanilinaseton serta uji aktivitasnya sebagai antioksidan dan efek sitotoksiknya terhadap sel hela.

Modifikasi struktur dilakukan melalui reaksi kondensasi aldol silang antara aseton dan vanillin dengan perbandingan mol 1:2 untuk sintesis divanilinaseton serta asetofenon dan vanillin 1:1 untuk sintesis vanilinasetofenon. Karakterisasi dilakukan menggunakan FTIR, TLC dan MS. Ujiaktivitas antioksidan dilakukan secara *in vitro* dengan metode penghambatan degradasi 2-deoksiribosa. Uji efek sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT.

Hasil modifikasi struktur menunjukkan bahwa divanilinaseton berhasil disintesis melalui reaksi kondensasi aldol. Hasil analisis terhadap hasil sintesis vanilinasetofenon belum memberikan hasil sesuai target, tetapi kembali ke bahan awal yaitu vanillin. Uji aktivitas antioksidan hasil sintesis menunjukkan bahwa divanililaseton aktif sebagai antioksidan sedangkan vanililaseton tidak aktif. Uji efek sitotoksik terhadap sel HeLa menunjukkan kedua senyawa hasil modifikasi yaitu vanililaseton dan divanililaseton sangat aktif.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI DAFTAR	v
GAMBAR DAFTAR	v
TABEL IDENTITAS	vi
PENELITI	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
1. Latar belakang	1
2. Urgensi Penelitian	2
3. Luaran (output) Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
1. Vanilin dan Cara Isolasinya	4
2. Kondensasi Aldol Silang	5
3. Aktivitas Antioksidan	7
4. Potensi Antikanker	8
5. Roadmap Penelitian	9
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
1. Tujuan khusus	12
2. Manfaat Penelitian	12
BAB IV METODE PENELITIAN	13
1. Sintesis vanililasetofenon	13
2. Sintesis divanililaseton	13
3. Uji aktivitas antioksidan	14
4. Efek sitotoksik pada sel HeLa dengan metode MTT	15
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	16
1. Hasil Penelitian	16
2. Pembahasan	17

a. Modifikasi struktur vanillin.	17
b. Uji aktivitas Antioksidan	23
c. Hasil Uji Efek Sitotoksik terhadap Sel HeLa	26
BAB VI KESIMPULAN	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Buah vanili (sumber: Ramadani, 2009)	4
Gambar 2. Struktur vanilin (4-hidroksi-3-metoksi benzaldehida)	5
Gambar 3. Mekanisme reaksi sintesis benzalaseton	6
Gambar 4. Mekanisme reaksi sintesis dibenzalaseton (1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on)	6
Gambar 5. Struktur vanililaseton, vanililasetofenon dan divanililaseton	7
Gambar 6. Reaksi 2-deoksiribosa dengan radikal hidroksil ⁸	8
Gambar 7. Mekanisme reaksi sintesis divanililaseton	18
Gambar 8. Spektra FTIR divanililaseton	19
Gambar 9. Kromatogram divanililaseton	19
Gambar 10. Spektra massa divanililaseton	19
Gambar 11. Spektra FTIR senyawa hasil sintesis vanililasetofenon	21
Gambar 12. Kromatogram senyawa hasil sintesis vanililasetofenon	21
Gambar 13a,b,c. Spektra massa senyawa hasil sintesis vanililasetofenon	22
Gambar 14. Grafik aktivitas antioksidan BHT	24
Gambar 15. Grafik aktivitas antioksidan divanililaseton	24
Gambar 16. Grafik aktivitas antioksidan vanililaseton	25
Gambar 17. Grafik aktivitas antioksidan vanilin isolasi	25
Gambar 18a. Pengaruh perlakuan vanililaseton terhadap viabilitas sel HeLa	26
Gambar 18b. Pengaruh perlakuan divanililaseton terhadap viabilitas sel HeLa	27
Gambar 18c. Pengaruh perlakuan vanillin isolasi terhadap viabilitas sel HeLa	27
Gambar 19. Morfologi Sel HeLa (a) tanpa perlakuan, (b) perlakuan dengan vanililaseton 100 µg/mL (c) perlakuan dengan divanililaseton 100 µg/mL, dan (d) perlakuan dengan vanillin isolasi 100 µg/mL.	28

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Data modifikasi struktur vanillin	16
Tabel 2. Hasil ujiaktivitas antioksidan senyawa hasil modifikasi	16
Tabel 3. Hasil uji efek sitotoksik senyawa hasil modifikasi	17
Tabel 4. Hasil uji aktivitas sebagai penangkap radikal hidroksil	23

BAB I PENDAHULUAN

1. Latar belakang

Kanker adalah salah satu penyakit yang menyebabkan angka kematian cukup tinggi karena belum ditemukannya obat yang dapat menyembuhkan secara tuntas. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu agen kemopreventif baru yaitu suatu senyawa yang dapat mencegah dan menghambat proses perkembangan kanker baik dari bahan alam, sintetik maupun modifikasi dari keduanya yaitu dengan cara semisintetik dengan mengandalkan bahan alam yang potensial. Biasanya senyawa yang aktif sebagai antioksidan adalah senyawa yang berpotensi tinggi sebagai kandidat antikanker.

Betula platyphylla var. *japonica* (Eun Mi Ju et.al, 2002), buah berry (Juranic, Z. and Zizak, Z., 2006), kedelai hitam (Sri Atun. dkk, 2010) dan kulit batang *Hopea odorata* (Nurfina, A., Sri Atun. dan Retno, A., 2010) adalah bahan alam yang menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan dan telah diuji sifat antikankernya. Keempat bahan alam tersebut memiliki potensi aktivitas biologis sebagai antioksidan dan antikanker karena strukturnya memiliki gugus polifenol. Selain turunan fenolat, aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh beberapa turunan benzalaseton (Sri Handayani dan Indyah, S.A., 2008), dibenzalaseton asimetris (Sri Handayani dkk., 2009), dan hidroksidibenzalaseton (Sri Handayani dkk., 2010) yang disintesis dari turunan benzaldehida menggunakan reaksi kondensasi aldol silang dalam suasana basa.

Pada penelitian tahun pertama telah diperoleh senyawa turunan benzalaseton yaitu vanilinaseton yang disintesis dari vanilin, suatu turunan benzaldehida hasil isolasi buah vanili (*Vanilla planifolia* Andrews). Pada penelitian tersebut kemurnian dan rendemen vanililaseton sudah cukup tinggi, tetapi untuk vanililasetofenon dan divanililaseton yang diperoleh masih berupa campuran dengan sisa bahan dasar. Karena waktu penelitian yang sangat terbatas dan analisis NMR di LIPI memerlukan waktu antri sekitar 1 bulan, maka untuk mengulang sintesis sehingga didapatkan senyawa murni belum sempat dilakukan. Oleh karena itu dalam penelitian tahun kedua ini akan dilanjutkan dengan sintesis ulang dan pemisahan senyawa tersebut serta ujiaktivitas antioksidan dan antikanker terhadap semua hasil sintesis yang diperoleh. Uji aktivitas antioksidan akan dilakukan menggunakan metode degradasi 2-deoksiribosa, sedangkan uji aktivitas sebagai

antikanker akan ditentukan dengan melihat efek sitotoksiknya terhadap sel HeLa dengan metode MTT.

2. Urgensi Penelitian

Senyawa polifenol seperti flavonoid dan kurkumin telah dikenal memiliki aktivitas antioksidan karena memiliki kemampuan membentuk ion fenolat jika direaksikan dengan hidrogen peroksida sebagai sumber radikal. Senyawa-senyawa yang aktif sebagai antioksidan biasanya memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi senyawa kandidat antikanker. Benzalaseton adalah senyawa yang memiliki gugus benzena dan substituen yang dapat dimodifikasi sesuai kebutuhan untuk membentuk struktur homolognya.

Beberapa turunan hidroksidibenzalaseton terbukti aktif sebagai antioksidan karena memiliki gugus fenol. Oleh karena itu perlu dilakukan modifikasi struktur benzalaseton dengan cara menambahkan gugus hidroksi pada cincin benzennya agar diperoleh benzalaseton yang memiliki gugus fenol. Salah satu cara untuk menambahkan gugus hidroksi pada benzalaseton adalah dengan variasi bahan dasarnya, yaitu benzaldehida. Salah satu turunan benzaldehida yang memiliki gugus hidroksi adalah vanillin atau 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida.

Vanilin dapat diperoleh dengan cara sintesis, semi sintesis maupun isolasi dari bahan alam. Keragaman hayati yang sangat luas di Indonesia lebih memungkinkan dan menguntungkan untuk mendapatkan vanilin dengan cara isolasi dari bahan alam. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi vanilin dari buah vanili untuk digunakan sebagai bahan dasar sintesis dan modifikasi struktur vanilin menjadi vanililaseton, divanililaseton dan vanililasetofenon.

Vanilin sebagai salah satu senyawa fenolat sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi senyawa antioksidan dan selanjutnya sebagai kandidat antikanker. Hal ini berkaitan dengan strukturnya yang memiliki kemampuan untuk dimodifikasi lebih jauh menjadi turunannya dengan cara kondensasi aldol silang dengan senyawa karbonil lain yang memiliki $H\alpha$. Penelitian ini penting untuk dilakukan dan diharapkan dapat membantu menemukan kandidat senyawa yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan agen kemopreventif dengan memanfaatkan keragaman hayati yang ada di Indonesia.

3. Luaran (output) Penelitian

Luaran yang akan dicapai dari penelitian ini adalah :

1. Pemanfaatan buah vanili menjadi bahan baku pembuatan senyawa yang berpotensi menjadi antioksidan dan kandidat antikanker
2. Manuskrip untuk dipublikasikan pada seminar internasional (1 judul) pada akhir tahun pertama
3. Manuskrip untuk dipublikasikan pada jurnal nasional (1 judul) pada akhir tahun pertama
4. Manuskrip untuk dipublikasikan pada jurnal nasional (1 judul) pada tengah tahun kedua
5. Manuskrip untuk dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi (1 judul) pada akhir tahun kedua

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1. Vanilin dan Cara Isolasinya

Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews, Gambar 1) adalah salah satu sumber hayati yang melimpah di daerah tropis khususnya Indonesia. Vanili Indonesia dikenal di pasar internasional dengan nama *Java Vanilla Beans*. Luas areal tanam vanili Indonesia menurut data Direktorat Jendral Perkebunan Departemen Pertanian tahun 2008 adalah 25.429 ha (balittri.litbang.deptan.go.id). Pemasukan devisa negara melalui ekspor vanili pada tahun 2000 sebesar US\$31,4juta yang hampir semuanya dalam bentuk mentah. Oleh karena itu usaha peningkatan produksi vanili selalu dilakukan oleh para praktisi peneliti perkebunan (Unang Mansur, 2009; Cecep Virman, 2008).

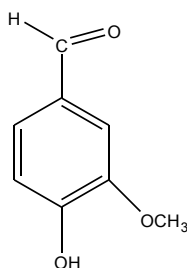


Gambar 1. Buah vanili (sumber: Ramadani, 2009)

Buah vanili terdiri dari dua bagian utama, dinding buah yang berwarna hijau (60%) dan bagian putih (20%) yang berperan penting dalam biosintesis vanilin. Kandungan utama buah vanili adalah vanilin, suatu senyawa aroma sekitar 85%. Senyawa minor lain dalam buah vanili adalah p-hidroksibenzaldehida dan p-metoksibenzil metileter.

Vanilin (4-hidroksi-3-metoksi benzaldehida) seperti ditunjukkan pada Gambar 2 adalah senyawa pemberi aroma khas pada vanili. Vanilin merupakan turunan benzaldehida sehingga mempunyai struktur aromatik benzena dan gugus fungsi aldehida (CHO). Selain itu, vanilin mempunyai gugus fungsi lain yaitu hidroksi (-OH) dan metoksi (-OCH₃).

Vanilin merupakan kristal berwarna putih. Senyawa tersebut mempunyai massa molekul 152,14, titik lebur 80-81 °C dengan titik didih 285 °C (<http://en.wikipedia.org/wiki/Vanillin>).



Gambar 2. Struktur vanilin (4-hidroksi-3-metoksi benzaldehida).

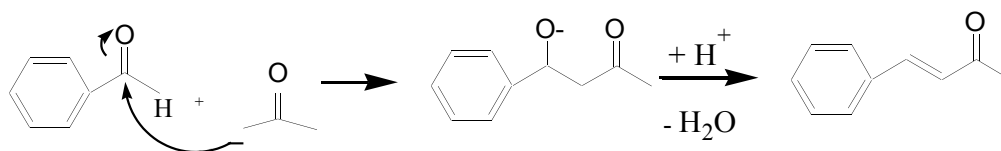
Vanilin dapat diisolasi dari buah vanili kering maupun dari buah vanili segar. Cara isolasi yang digunakan cukup beragam, diantaranya adalah dengan cara reaksi enzimatik buah vanili segar (Indriana S.A., 2006), ekstraksi menggunakan oktilamina (V.E. Tarabanko et.al., 2007), maupun perbandingan metode antara sokletasi dengan ekstraksi dengan bantuan ultrasound (Dnyaneswar, J., et.al., 2009). Masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan, sehingga perlu didapatkan metode yang efektif, efisien, murah dan memberikan rendemen yang tinggi.

2. Kondensasi Aldol Silang

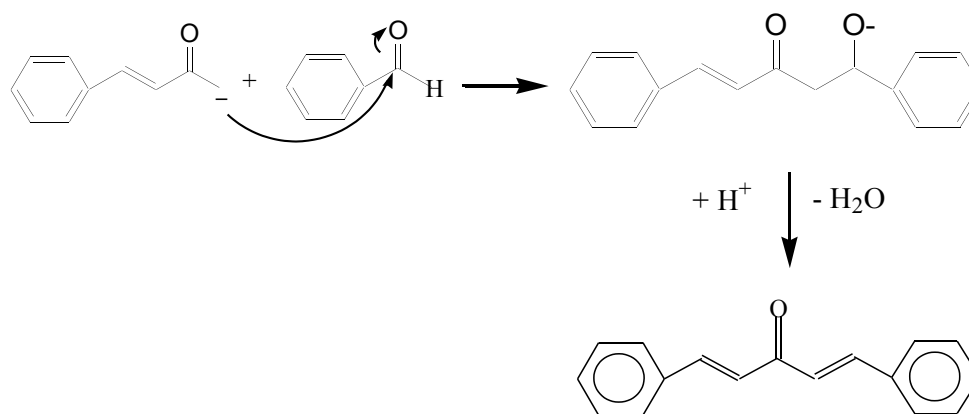
Kondensasi aldol adalah reaksi organik antara dua molekul aldehida atau satu molekul aldehida dengan satu molekul keton menghasilkan senyawa aldol. Reaksi aldol dapat berjalan melalui dua mekanisme yaitu mekanisme enol yang menggunakan katalis asam kuat dan mekanisme enolat yang menggunakan katalis basa kuat.

Reaksi kondensasi aldol silang yang melibatkan penggunaan senyawa aldehida aromatis dan senyawa alkil keton atau aril keton sebagai reaktannya dikenal sebagai reaksi Claisen schmidt. Reaksi ini melibatkan ion enolat dari senyawa keton yang bertindak sebagai nukleofil untuk menyerang karbon karbonil senyawa aldehida aromatis menghasilkan senyawa β -hidroksi keton, yang selanjutnya mengalami dehidrasi menghasilkan senyawa α,β -keton tak jenuh (Bruice, 2007).

Benzalaseton (4-fenil-4-buten-2-on) disintesis dengan cara kondensasi aldol silang antara benzaldehida dan aseton dengan reaksi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme reaksi sintesis benzalaseton



Gambar 4. Mekanisme reaksi sintesis dibenzalaseton (1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on)

Dibenzalaseton adalah senyawa yang disintesis dengan cara kondensasi aldol silang antara benzalaseton dengan benzaldehida atau antara aseton dengan benzaldehida berlebihan. Reaksi sintesis dibenzalaseton disajikan pada Gambar 4.

Reaksi kondensasi aldol silang dapat dilakukan antara beberapa turunan benzaldehida dengan asetofenon membentuk senyawa benziliden asetofenon (kalkon), suatu golongan dari flavonoid (Sugeng, T., dan Winarto, H., 2009). Reaksi kondensasi aldol silang antara beberapa turunan benzaldehida dengan aseton dengan variasi mol reaktan dapat membentuk benzalaseton dan dibenzalaseton (Sri Handayani dan Indyah, S.A., 2009), dibenzalaseton asimetris (Sri Handayani, 2009), dan dihidroksidibenzalaseton (Sri Handayani, dkk., 2010).

Vanilin sebagai salah satu turunan benzaldehida yang tidak memiliki H_{α} dapat bereaksi kondensasi aldol silang dengan aldehida ataupun keton lain yang memiliki H_{α} , misalnya aseton membentuk vanililaseton maupun divanililaseton. Jika vanillin dikondensasikan dengan asetofenon, maka akan membentuk senyawa vanililasetofenon (Gambar 5).

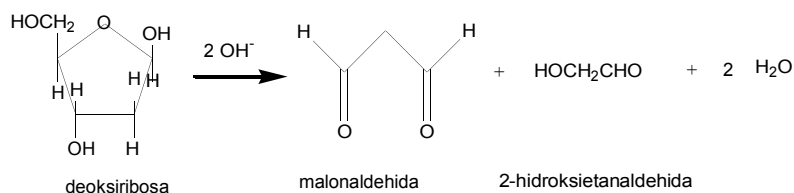
Gambar 5. Struktur vanililaseton, vanililasetofenon dan divanililaseton

3. Aktivitas Antioksidan

Studi epidemiologi menunjukkan bahwa konsumsi buah dan sayuran dengan senyawa fenolat yang tinggi akan mengurangi resiko terhadap penyakit degenerative seperti kanker dan serebrovaskular. Senyawa fenolat menghasilkan efek tersebut dengan cara menangkap radikal bebas (Gil. et.al., 2000). Senyawa yang memiliki fungsi dapat menangkap radikal bebas biasa disebut sebagai antioksidan. Dalam arti yang lebih spesifik, antioksidan adalah zat yang dapat mencegah atau menunda reaksi antioksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipida (Trilaksani W.,2003). Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman misalnya pada kayu, kulit kayu, akar, daun, bunga, buah, biji maupun pada serbuk sari (Pratt, D.E., 1992).

Pengujian terhadap aktivitas sebagai antioksidan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara *in vivo* dan *in vitro*. Pada penelitian ini akan dilakukan kajian secara *in vitro* menggunakan metode Fenton sebagai penghasil radikal bebas. Reaksi bebas adalah suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Secara teoritis radikal bebas dapat terbentuk jika terjadi pemisahan ikatan kovalen.

Radikal hidroksil akan bereaksi dengan 2-deoksiribosa membentuk malonaldehida dengan reaksi seperti Gambar 6 berikut ini :



Gambar 6. Reaksi 2-deoksiribosa dengan radikal hidroksil

Adanya sampel yang mengandung senyawa yang dapat menangkap radikal hidroksil akan mengurangi kerusakan 2-deoksiribosa. Adanya malonaldehida dapat diidentifikasi dengan asam tiobarbiturat yang membentuk kompleks warna merah sehingga dapat ditetapkan secara

spektrofotometri (Subiyarti D., 2005). Uji aktivitas sebagai antioksidan dari kulit pisang telah dilaporkan oleh Sri Atun, Retno dan Handayani (2005).

4. Potensi Antikanker

Kanker adalah salah satu penyakit yang menyebabkan angka kematian cukup tinggi karena belum ditemukannya obat yang dapat menyembuhkan secara tuntas. Kanker merupakan penyakit sel yang ditandai dengan hilangnya fungsi kontrol sel terhadap regulasi daur sel pada organism multiseluler. Jika kontrol sel tidak berfungsi maka sel akan berkembang terus sehingga muncul pertumbuhan sel abnormal. Pengobatan kanker telah berkembang dengan berbagai mekanisme diantaranya adalah merangsang diferensiasi sel atau merubah sel ganas menjadi jinak, meningkatkan efektivitas radiasi maupun mengubah respon imun sel kanker dengan sel sehat. Tapi berbagai obat tersebut memiliki kelemahan diantaranya dalam hal resistensi dan toleransi obat serta efek samping yang ditimbulkannya (Edy Meiyanto, 2008). Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu agen kemopreventif baru yaitu suatu senyawa yang dapat mencegah dan menghambat proses perkembangan kanker baik dari bahan alam, sintetik maupun modifikasi dari keduanya yaitu dengan cara semisintetik dengan mengandalkan bahan alam yang potensial.

Dari beberapa penelitian terdahulu, senyawa yang memiliki gugus fenolat diketahui aktif sebagai antioksidan dan berpotensi sebagai senyawa kadidat antikanker. Muhammad Da'i dkk. (2007), telah meneliti efek struktur geometrik senyawa PGV-1 dan PGV-0 suatu senyawa analog kurkumin yang mempunyai gugus fenolat terhadap efek sitotoksiknya pada sel T47D serta membandingkannya dengan kurkumin. Hasil yang diperoleh adalah PGV1 lebih berpotensi sebagai senyawa antikanker. Senyawa bioaktif dari beberapa jenis buah yang mengandung gugus fenolat seperti flavonoid, asam folat, β -karoten, limonoid dan beberapa jenis serat ternyata memiliki potensi sebagai antikanker (Silalahi, J.,2002).

5. Roadmap Penelitian

Kajian tentang sintesis serangkaian homolog benzalaseton telah dilaporkan dalam beberapa publikasi. Beberapa turunan metoksibenzalaseton seperti anisalaseton, veratralaseton dan sinamalaseton disintesis melalui kondensasi aldol silang antara benzaldehida atau turunannya dengan aseton menggunakan katalis basa. Perbandingan mol reaktan yang digunakan adalah 1:1. Selain itu juga digunakan perbandingan mol benzaldehida (atau turunannya) dan aseton 2:1 untuk

mensintesis dimetoksidibenzalaseton. Hasil yang diperoleh adalah serbuk dengan warna kuning sampai orange. Senyawa hasil yang diperoleh diuji aktivitasnya sebagai antioksidan dengan metode degradasi deoksiribosa. Senyawa yang aktif sebagai antioksidan adalah anisalaseton, veratralaseton, dibenzalaseton, diveratralaseton dan disinamalaseton (Sri Handayani dan Indyah, S.A., 2008).

Dibenzalaseton asimetris adalah dibenzalaseton yang memiliki jumlah, jenis dan posisi substituent berbeda di kedua cincin benzennya. Dibenzalaseton asimetris yang telah disintesis adalah benzalveratralaseton (15,53%) dengan bahan dasar benzaldehida, aseton dan veratraldehida dengan perbandingan mol 1:1:1. Selain itu juga telah dilakukan sintesis anisalbenzalaseton (10,6%) dengan bahan dasar anisalaldehida, aseton dan benzaldehida. Kedua senyawa tersebut disintesis menggunakan reaksi kondensasi aldol silang dengan katalis basa. Pemurnian dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen etilasetat-heksana 1:9. Rendemen yang diperoleh cukup bagus karena dalam reaksi tersebut secara teori terdapat beberapa macam senyawa sebagai hasil samping. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut aktif ditandai dengan harga IC_{50} berturut-turut sebesar 1,02 dan 1,7 μ M (Sri Handayani, dkk., 2009). Selain itu kedua senyawa dibenzalaseton asimetris tersebut juga menunjukkan potensi sebagai senyawa tabir surya (Sri Handayani, dkk., 2009). Senyawa hidrosidibenzalaseton juga terbukti aktif sebagai antioksidan. 2,2-dihidrosidibenzalaseton dan 3,3-dihidrosidibenzalaseton telah disintesis melalui kondensasi aldol silang antara 2-hidrosibenzalaldehida dan 3-hidrosibenzalaldehida dengan aseton (Sri Handayani, dkk., 2010).

Dari penelitian yang telah dilakukan ditemukan bahwa beberapa turunan benzalaseton baik yang memiliki gugus hidroksi maupun gugus metoksi secara terpisah terbukti aktif sebagai antioksidan. Kelemahan dari serangkaian penelitian yang telah dilakukan adalah belum pernah dilakukan sintesis turunan benzalaseton yang memiliki gugus hidroksi dan metoksi sekaligus. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian aktivitas senyawa turunan benzalaseton yang memiliki substituent hidroksi dan metoksi sekaligus pada satu cincin yang sama.

Vanilin adalah turunan benzaldehida yang memiliki gugus hidroksi pada C nomor 4 dan gugus metoksi pada C nomor 3 dalam cincin benzennya sehingga nama IUPACnya adalah 4-hidroksi-3-metoksibenzalaldehida. Vanilin di alam terkandung di dalam buah vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) sekitar 85%. Sehingga dalam penelitian ini akan dilakukan modifikasi struktur vanilin yang diisolasi dari buah vanili menjadi turunan benzalaseton dan benzilidenasetofenon yaitu

vanililaseton, divanililaseton dan vanililasetofenon. Selanjutnya akan dikaji potensinya sebagai antioksidan dan kandidat antikanker.

Langkah pertama dari penelitian ini adalah optimasi kondisi isolasi vanilin melalui ekstraksi soklet dengan 3 macam pelarut yaitu etanol, kloroform dan etilasetat. Kondisi optimum ditentukan dengan cara menentukan rendemen tertinggi dari ekstraksi dengan variasi pelarut. Vanilin yang telah dimurnikan selanjutnya digunakan untuk bahan sintesis turunan vanilin pada tahap berikutnya.

Langkah kedua dari penelitian ini adalah sintesis vanililaseton, divanililaseton dan vanililasetofenon. Sintesis ketiga senyawa tersebut dilakukan menggunakan reaksi kondensasi aldol silang dengan mekanisme enolat pada suasana basa. Suhu yang digunakan selama reaksi diusahakan di bawah suhu kamar dengan cara menggunakan bak es selama reaksi. Senyawa hasil sintesis dimurnikan dengan cara rekristalisasi atau dengan kromatografi kolom jika metode rekristalisasi tidak dapat dilakukan. Elusidasi struktur dilakukan menggunakan FTIR dan NMR dua dimensi.

Langkah terakhir dari penelitian ini adalah pengujian aktivitasnya sebagai antioksidan dan uji potensinya sebagai senyawa kandidat antikanker. Uji aktivitas sebagai antioksidan dilakukan dengan metode degradasi deoksiribosa dari Halliwell. Uji potensi sebagai kandidat antikanker dilakukan dengan menentukan efek sitotoksiknya terhadap sel HeLa menggunakan metode MTT.

Rencana program penelitian selanjutnya adalah uji aktivitas ketiga senyawa hasil sintesis sebagai senyawa antikanker dengan cara melihat profil penghambatannya terhadap sel kanker lain. Pengamatan pertumbuhan sel dan induksi apoptosis dilakukan juga terhadap beberapa sel kanker lain seperti sel payudara. Jika turunan vanilin dalam penelitian ini potensial sebagai kandidat antikanker, selanjutnya sintesis senyawa lain yang memiliki struktur serupa dapat pula dilakukan.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. Tujuan khusus

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian tahun kedua ini adalah :

1. Sintesis ulang vanililasetofenon dan divanililaseton melalui reaksi kondensasi aldol silang dengan katalis basa.
2. Uji aktifitas antioksidan secara in vitro menggunakan metode degradasi deoksiribosa.
3. Mempelajari potensi sebagai kandidat antikanker melalui efek sitotoksiknya terhadap sel HeLa dengan metode MTT.

2. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Memanfaatkan buah vanili yang berlimpah di Indonesia menjadi bahan baku senyawa yang lebih bermanfaat
2. Meningkatkan nilai ekonomi buah vanili menjadi senyawa lain yang bernilai tinggi
3. Memberikan data aktivitas turunan vanilin sebagai antioksidan dan potensinya sebagai kandidat senyawa antikanker

BAB IV METODE PENELITIAN

Metode penelitian ini terbagi dalam tiga tahapan. Tahap pertama adalah isolasi vanillin dari buah vanili, tahap kedua modifikasi struktur vanillin dan tahap terakhir yaitu uji aktivitas senyawa sebagai antioksidan dan kandidat antikanker. Tahap pertama dan kedua telah dikerjakan pada tahun pertama, sedangkan tahap ketiga akan dilaksanakan pada tahun kedua.

Dari hasil penelitian tahun pertama telah didapatkan vanililaseton murni, tapi untuk vanililasetofenon dan divanililasetofenon masih perlu diulang sintesis lagi. Setelah itu dilanjutkan dengan ujiaktivitas antioksidan dan anti kanker dengan prosedur sebagai berikut :

5. Sintesis vanililasetofenon

Sintesis vanililasetofenon dilakukan dengan cara melarutkan 0,015 mol 0,6 g NaOH dalam campuran 5 mL etanol dan 5 mL air, kemudian dinginkan dengan bak es. Tambahkan 0,01 mol 1,2 g asetofenon sedikit demi sedikit sambil diaduk. Setelah itu tambahkan 0,01 mol 1,52 g vanilin ke dalam larutan secara bertetes-tetes. Suhu dijaga tetap di bawah suhu kamar selama 3 jam pengadukan atau sampai terlihat terbentuk endapan. Setelah 3 jam atau lebih, pengadukan dihentikan, kemudian tambahkan 3 mL akuades. Saring endapan yang terbentuk menggunakan penyaring buhner dan dicuci dengan air sampai pH kurang dari 7. Pemurnian dilakukan menggunakan metode rekristalisasi. Pemurnian dilakukan menggunakan metode rekristalisasi. Jika tidak dapat dimurnikan dengan rekristalisasi maka pemurnian dilakukan menggunakan kromatografi kolom gravitasi. Tentukan sifat fisiknya melalui pengamatan warna, titik leleh dan berat hasil. Uji kemurnian dilakukan dengan KLT dan KLT-scanner. Elusidasi struktur dilakukan menggunakan FTIR dan MS.

6. Sintesis divanililaseton

Sintesis divanililaseton dilakukan dengan cara yang hampir sama tetapi bahan yang dipakai adalah aseton-vanilin dengan perbandingan molar 1:2. Natrium hidroksida sebanyak 0,015 mol (0,6 g) dilarutkan dalam 15 mL air. Tambahkan 0,005 mol (0,3 g) aseton dan 0,01 mol (1,52) g vanilin. Setelah diaduk selama 3 jam kemudian pada hasil reaksi ditambahkan 1 mL HCl. Pisahkan endapan dari pelarutnya kemudian sisa larutan dimasukkan ke dalam kulkas selama 2 minggu. Endapan coklat yang muncul dari sisa larutan tersebut adalah target yang diinginkan, lalu disaring, dikeringkan kemudian ditimbang. Karakterisasi dilakukan dengan cara yang sama pula.

7. Uji aktivitas antioksidan

Ketiga sampel yang didapat kemudian diuji aktifitas antioksidannya dengan metode pencegah kerusakan deoksiribosa dari Halliwell (1987) dengan cara sebagai berikut :

Masukkan larutan 0,2 mL 5 mM larutan 2-deoksiribosa; 0,2 mL larutan buffer fosfat pada pH 7,4; 0,2 mL 0,5 mM larutan H₂O₂; 0,2 mL 5 mM larutan asam askorbat dalam HCl; 0,2 mL 0,5 mM Ferrosulfat; 0,02 mL larutan sampel dalam berbagai konsentrasi (50, 100, 250, 500 dan 1000 ppm) dan ke dalam tabung reaksi. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi pada 37⁰C selama 30 menit. Produk peroksidasi ditambah 1 mL reagen TBA 1% dan 1mL TCA 25% kemudian dipanaskan selama 15 menit pada suhu 80⁰C. Selanjutnya larutan didinginkan dan disentrifus selama 5 menit, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Kemampuan mencegah degradasi 2-deoksiribosa dihitung sebagai % berkurangnya absorbansi larutan yang mengandung senyawa bioaktif yang mencegah degradasi 2-deoksiribosa dibandingkan dengan larutan yang tidak mengandung senyawa bioaktif.

% aktivitas penghambatan degradasi deoksiribosa oleh sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\%aktivitas = \frac{Ablangko - Asampel}{Ablangko} \times 100\%$$

Dari %penghambatan tersebut dapat ditentukan IC₅₀ nya dengan cara perhitungan menggunakan regresi linier dari beberapa konsentrasi sampel. IC₅₀ adalah konsentrasi senyawa yang memberikan aktivitas penghambatan 50%.

8. Efek sitotoksik pada sel HeLa dengan metode MTT

Sel dengan konsentrasi 3 x 10³ sel/100 µl didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100 µl MK yang mengandung sampel dengan variasi kadar dan diinkubasi kembali selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100 µl PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 µl media kultur yang mengandung MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37⁰C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna warna ungu.

Setelah 4 jam, pada tiap sumuran ditambahkan reagen stopper untuk membunuh sel dan melarutkan kristal formazan. *Plate* di-*shaker* selama 10 menit kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

3. Hasil Penelitian

a. Hasil Modifikasi Struktur

Hasil modifikasi struktur vanilin disajikan pada Tabel 1 berikut ini

Tabel 1. Data modifikasi struktur vanillin

No.	Target/hasil th ke	Warna	Berat hasil (g)	Kadar (%)	Rendemen (%)
1.	Vanililaseton/1	Kuning	1,3	99,2	73,86
2.	Divanililaseton/2	Coklat	0,36	86,1	9,50
3.	Vanililasetofenon/2	Orange	1,08	66,14	28,12

b. Hasil uji Aktivitas Antioksidan

Hasil uji aktivitas antioksidan dari senyawa hasil modifikasi yang telah dikarakterisasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil ujiaktivitas antioksidan senyawa hasil modifikasi

No.	Senyawa	IC ₅₀ (µg/mL)	aktivitas
1.	BHT (kontrol)	156	Aktif
2.	divanililaseton	873	Aktif
3.	vanililaseton	11.765	Tidak aktif
4.	Vanillin isolasi	429	Aktif

c. Hasil Uji Efek Sitotoksik terhadap Sel HeLa

Hasil uji efek sitotoksik senyawa hasil yang telah dikarakterisasi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji efek sitotoksik senyawa hasil modifikasi

No.	Senyawa	IC ₅₀ (µg/mL)	aktivitas
1.	Vanililaseton	51,68	Sangat aktif
2.	Divanililaseton	10,26	Sangat aktif
3.	Vanillin isolasi	1.360,17	Aktivitas rendah

4. Pembahasan

d. Modifikasi struktur vanillin.

Modifikasi struktur vanillin yang dilakukan pada tahun kedua adalah sintesis divanililaseton dan vanililasetofenon. Kedua senyawa tersebut disintesis menggunakan bahan dasar vanillin hasil isolasi pada tahun pertama. Divanililaseton disintesis menggunakan perbandingan mol aseton-vanillin 1:2 sedangkan vanililasetofenon disintesis dengan perbandingan mol asetofenon-vanilin 1:1.

1. Sintesis divanililaseton

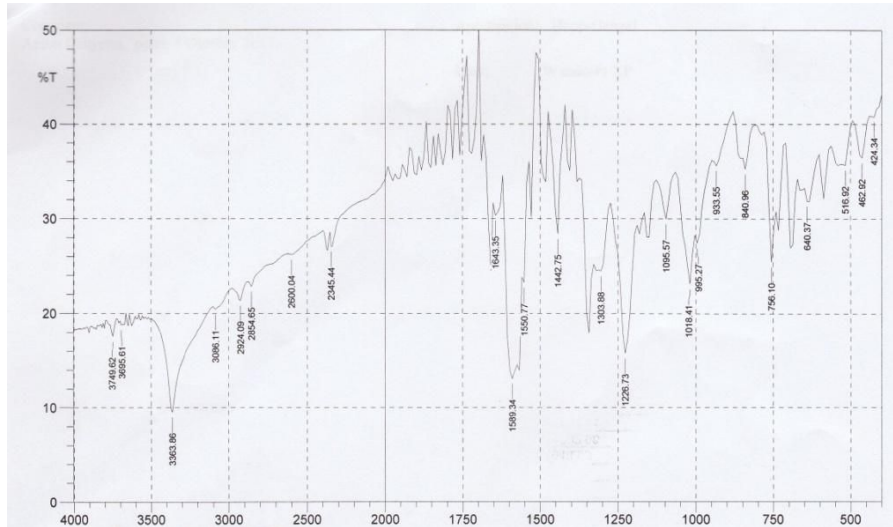
Hasil sintesis divanililaseton berupa padatan berwarna coklat seberat 0,36 g dengan rendemen 9,50%. Rendemen yang dihasilkan sangat rendah karena sebagian besar hasil sintesis kembali ke bahan awal yaitu vanillin. Hal ini terjadi karena reaksi kondensasi berjalan reversible. Selain itu pembentukan divanililaseton terjadi sangat lambat sehingga sulit untuk mencegah terkomposisinya hasil menjadi bahan awal lagi. Mekanisme reaksi sintesis divanililaseton disajikan pada Gambar 7 berikut

H

Gambar 7. Mekanisme reaksi sintesis divanililaseton

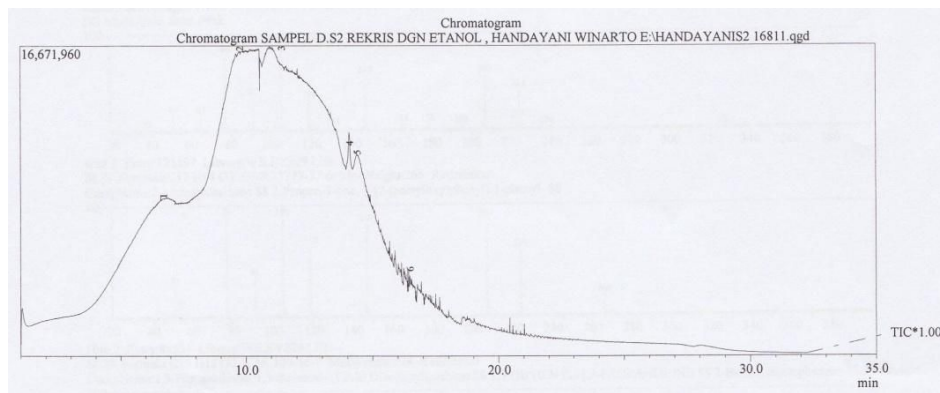
HO

Karakterisasi produk sintesis dilakukan menggunakan FTIR dan Spektrometer Massa. Hasil karakterisasi menggunakan FTIR (Gambar 8) menunjukkan adanya serapan tajam pada $3363,86\text{ cm}^{-1}$ dari gugus hidroksi. Serapan lemah pada $3066,11\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus aromatis. Gugus karbonil ditunjukkan serapan pada $1589,34\text{ cm}^{-1}$ sedangkan ikatan CH muncul pada $1442,75$ dan 1350 cm^{-1} . Ikatan CO eter muncul pada beberapa puncak berikut $1226,73$; $1095,57$ dan $1018,41\text{ cm}^{-1}$.

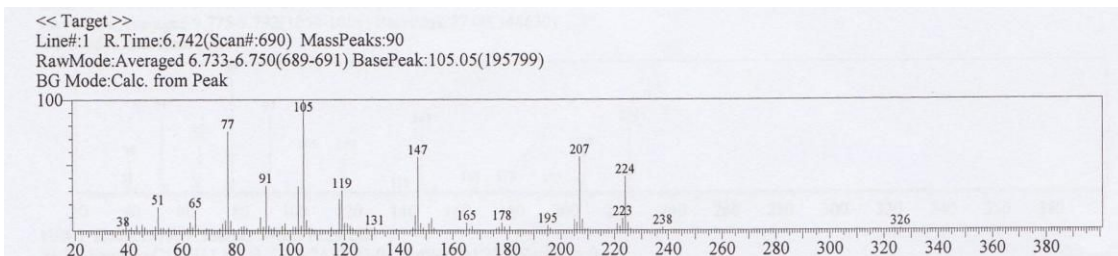


Gambar 8. Spektra FTIR divanililaseton

Karakterisasi menggunakan spektrometer massa *direct inlet* (Spektrometer Massa langsung tanpa melalui kromatografi gas) digunakan untuk mengetahui massa molekul senyawa hasil sintesis. Kromatogram divanililaseton disajikan pada Gambar 9, sedangkan spektra massa disajikan pada Gambar 10.



Gambar 9. Kromatogram divanililaseton



Gambar 10. Spektra massa divanililaseton

Kromatogram pada Gambar 9 bukan merupakan hasil pemisahan kromatografi gas, hal ini karena sampel dimasukkan secara langsung ke dalam spektrometer massa. Dari kromatogram

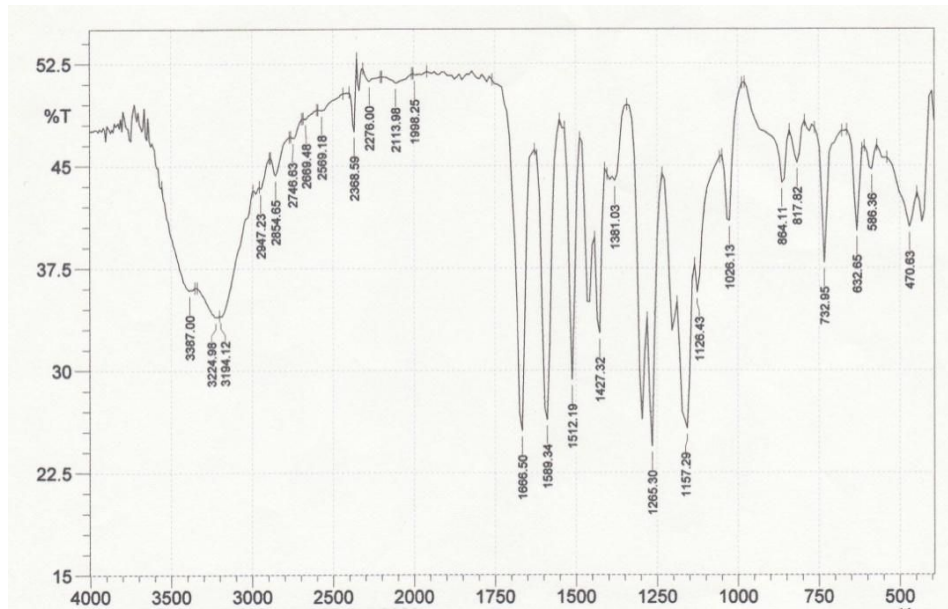
tersebut dapat diketahui bahwa sampel yang dianalisis memiliki kemurnian yang cukup tinggi karena spektra massa pada beberapa titik kromatogram tersebut sama. Berdasarkan data spektra massa pada Gambar 10, senyawa yang dianalisis ini memiliki massa molekul (m/z) 326. Dengan demikian massa molekul senyawa ini sesuai dengan massa molekul divanililaseton.

Berdasarkan data spektra FTIR dan MS dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis ini memiliki gugus hidroksi, aromatis, karbonil, CH dan CO eter serta memiliki massa molekul 326. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa yang disintesis adalah divanililaseton.

2. Sintesis vanililasetofenon.

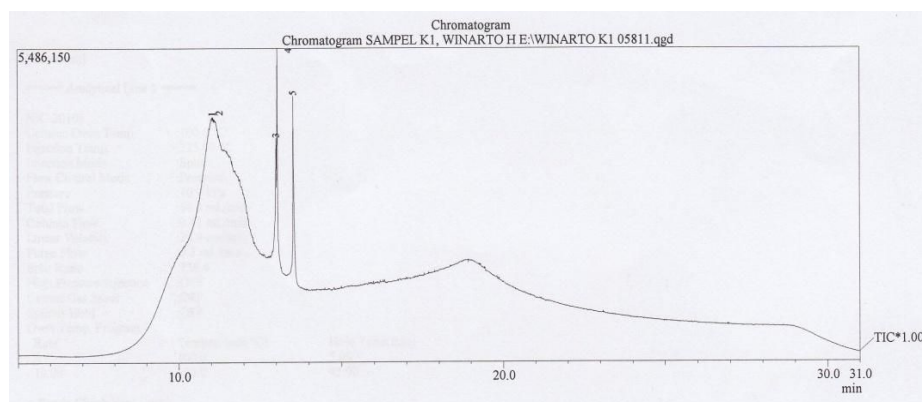
Sintesis vanililasetofenon dilakukan menggunakan reaksi kondensasi aldol silang antara asetofenon dan vanilin dengan perbandingan mol rasio 1 :1. Hasil sintesis berupa kristal berwarna orange dengan titik leleh $364-367^{\circ}\text{C}$ dengan rendemen reaksi sebesar 28,12%. Dari data titik lelehnya diduga vanilin telah berubah menjadi senyawa target karena jauh di atas titik leleh vanillin yang hanya berkisar $83-84^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya karakterisasi senyawa dilanjutkan dengan menggunakan TLC, TLC scanner, FTIR dan MS.

Data TLC menunjukkan antara R_f vanilin dan target hampir sama, namun data ini kurang mendukung keberhasilan sintesis. Analisis menggunakan FTIR (Gambar 11) menunjukkan adanya serapan melebar dari gugus hidroksi pada daerah $3100-3200\text{ cm}^{-1}$. Gugus karbonil ditunjukkan dengan adanya serapan tajam pada $1666,5\text{ cm}^{-1}$, C=C aromatis pada daerah $1427,32$; $1512,19$ dan $1589,34\text{ cm}^{-1}$, gugus C-O pada $1100-1200\text{ cm}^{-1}$. Pada daerah 2700 dan 2800 cm^{-1} terdapat puncak lemah khas dari CH aldehida. Dari puncak lemah khas aldehida tersebut diperkirakan target senyawa vanililasetofenon belum terjadi.

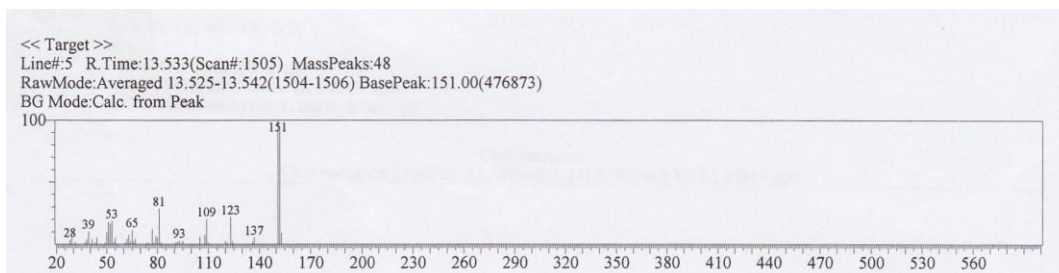


Gambar 11. Spektra FTIR senyawa hasil sintesis vanililasetofenon

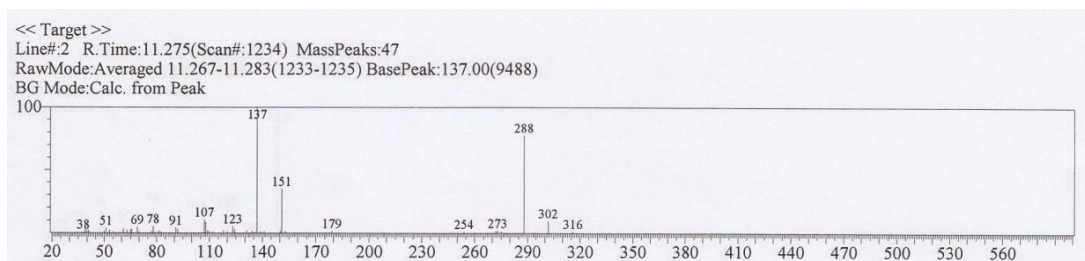
Selanjutnya elusidasi struktur dilanjutkan menggunakan Spektrometer Massa *direct inlet* untuk menentukan massa molekulnya. Kromatogram vanililasetofenon disajikan pada Gambar 12, spektra massa disajikan pada Gambar 13a, 13b dan 13c. Dari kromatogram pada Gambar 12 nampak bahwa sampel yang dianalisis merupakan campuran. Berdasarkan spektra massa pada Gambar 13, terdapat tiga macam massa molekul yaitu sebesar 302, 316 dan 151 sedangkan vanililasetofenon memiliki massa molekul sebesar 254. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil sintesis masih berupa campuran dengan sisa bahan awal yaitu vanilin dengan massa molekul 151.



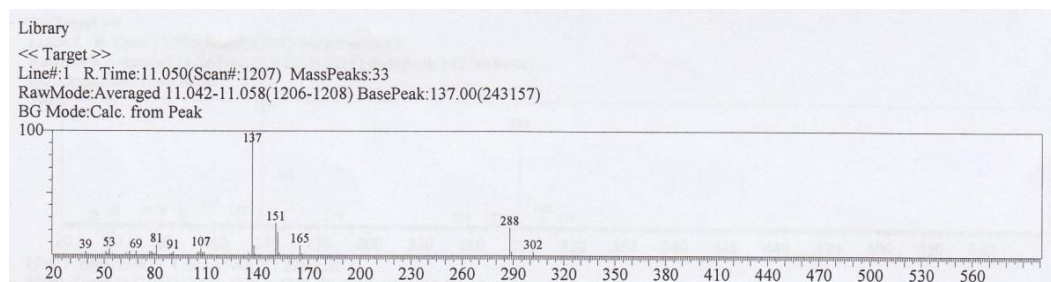
Gambar 12. Kromatogram senyawa hasil sintesis vanililasetofenon



13a.



13b.



13c.

Gambar 13a,b,c. Spektra massa senyawa hasil sintesis vanililasetofenon

Dari hasil elusidasi struktur menggunakan FTIR dan spectrometer massa, vanililasetofenon dalam penelitian ini belum berhasil disintesis. Hal ini disebabkan kondisi sintesis yang mungkin belum cocok. Dalam penelitian ini sintesis vanililasetofenon dilakukan dalam kondisi basa. Ketidakberhasilan sintesis ini diduga karena H yang terikat pada gugus OH pada cincin aromatik bersifat sangat asam sehingga mudah diserang oleh gugus OH dari NaOH sehingga membentuk fenolat. Dengan demikian tidak terjadi reaksi kondensasi aldol seperti yang diinginkan. Sehingga sebaiknya sintesis dilakukan pada kondisi asam untuk mencegah abstraksi H pada gugus hidroksi aromatik untuk membentuk fenolat.

e. Uji aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas senyawa hasil sintesis sebagai antioksidan dilakukan dengan reaksi fenton secara invitro. Reaksi diawali dengan penambahan larutan besi(II)sulfat dan H₂O₂ untuk menghasilkan radikal yang akan bereaksi dengan deoksiribosa. Reaksi dihentikan dengan penambahan campuran reagen TBA-TCA yang akan memberikan warna merah jika terbentuk malonaldehida sebagai hasil reaksi antara radikal dengan deoksiribosa. Warna merah ini diukur absorbansinya menggunakan spektrometer UV pada panjang gelombang maksimum. % aktivitas sebagai antioksidan dihitung sebagai persentase berkurangnya absorbansi larutan yang mengandung senyawa hasil sintesis yang dapat mencegah degradasi 2-deoksiribosa dibandingkan dengan larutan blangko. Hasil uji aktivitas disampaikan pada Gambar 14-17. IC₅₀ (*Inhibition concentration 50%*) dari senyawa hasil modifikasi dan BHT sebagai kontrol disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas sebagai penangkap radikal hidroksil

No.	Senyawa	Konsentrasi (µg/mL)	Rerata % aktivitas	IC ₅₀ (µg/mL)	Keterangan
1.	BHT	1000	41,24	159	Aktif
		500	43,55		
		250	46,71		
		125	51,33		
		62,5	52,67		
2.	Divanililaseton	1000	44,40	873	Aktif
		500	65,86		
		250	68,00		
		125	71,41		
		62,5	74,08		
3.	Vanililaseton	1000	59,24	11.765	Tidak aktif
		500	64,47		
		250	68,13		
		125	72,14		
		62,5	77,74		
4.	Vanillin hasil isolasi	1000	41,24	429	Aktif
		500	44,64		
		250	47,20		
		125	49,02		
		62,5	44,52		

Keterangan :

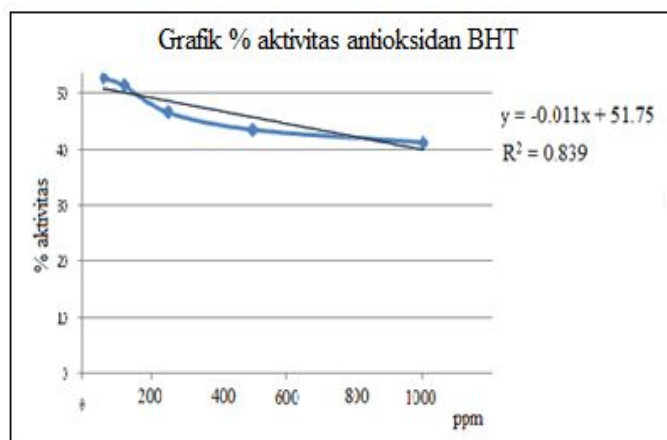
IC₅₀ < 100 µg/mL : sangat aktif

IC₅₀ 100-1000 µg/mL : aktif

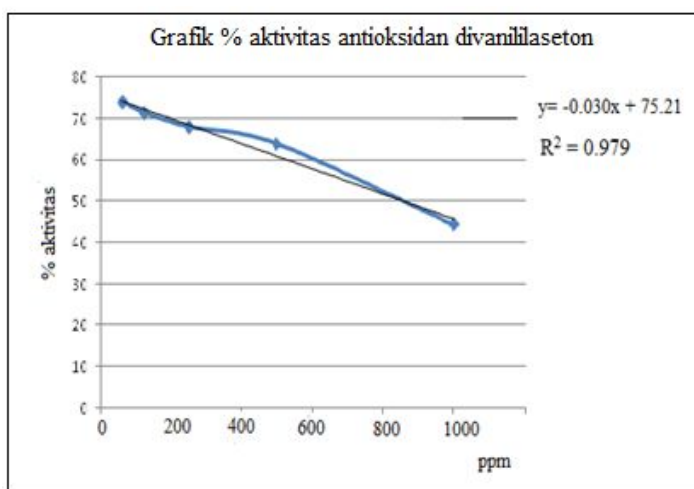
IC₅₀ 1000-5000 µg/mL : aktivitas rendah

IC₅₀ > 5000 µg/mL : tidak aktif

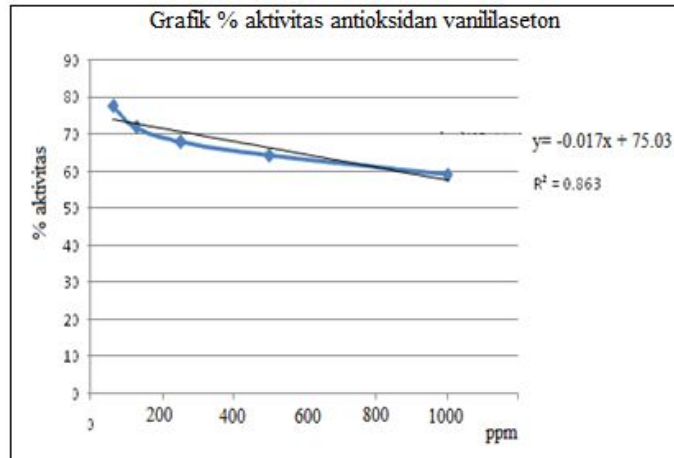
Grafik dari %aktivitas penghambatan degradasi deoksiribosa dan persamaan regresi dari masing-masing sampel disajikan pada Gambar 14-17 berikut ini. Gambar 14 menyajikan %aktivitas dari BHT yang digunakan sebagai pembanding.



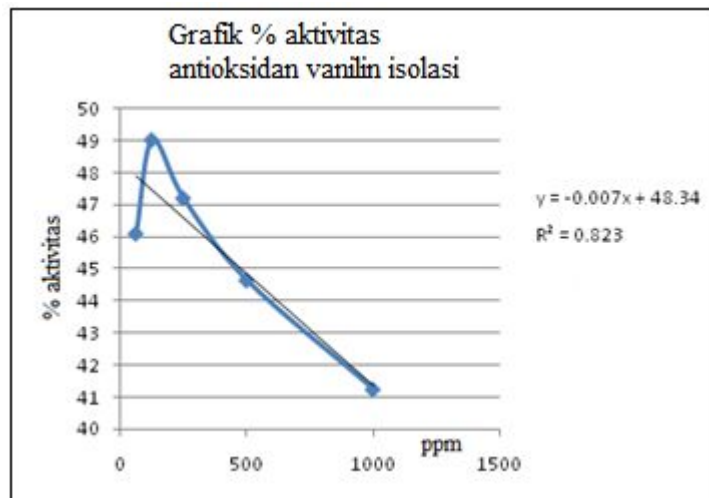
Gambar 14. Grafik aktivitas antioksidan BHT



Gambar 15. Grafik aktivitas antioksidan divanililaseton



Gambar 16. Grafik aktivitas antioksidan vanililaseton



Gambar 17. Grafik aktivitas antioksidan vanilin isolasi

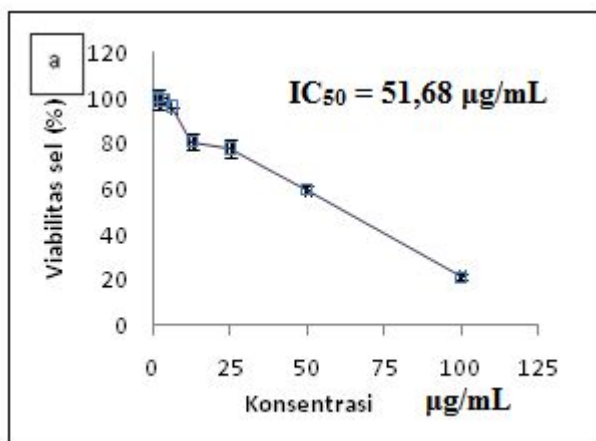
Data ujiaktivitas antioksidan 2 senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa divanililaseton aktif sebagai antioksidan sedangkan vanililaseton tidak aktif. BHT yang digunakan sebagai kontrol menunjukkan aktivitas yang paling tinggi ditandai dengan harga IC_{50} yang paling kecil yaitu 156. Sedangkan vanillin isolasi ternyata lebih aktif daripada divanililaseton. Divanililaseton lebih aktif sebagai antioksidan daripada vanililaseton karena memiliki gugus fenolat dan senyawa karbonil tak jenuh α,β lebih banyak. Seperti diketahui, aktivitas antioksidan atau kemudahan teroksidasi tergantung pada senyawa fenolat dan banyaknya ikatan rangkap.

f. Hasil Uji Efek Sitotoksik terhadap Sel HeLa

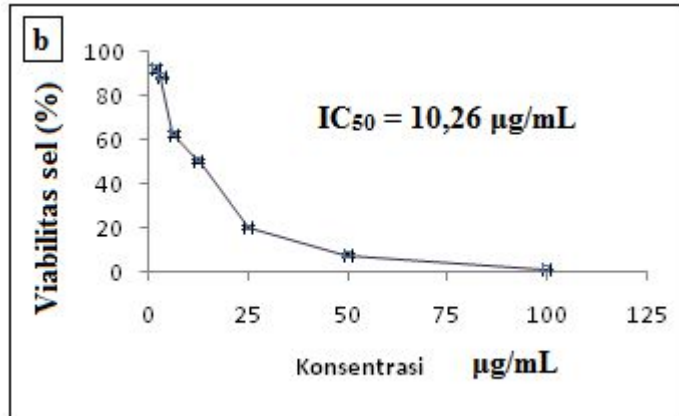
Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui efek perlakuan senyawa vanililaseton, divanililaseton, dan vanilin isolasi pada sel kanker HeLa. Dasar yang digunakan untuk menetapkan nilai sitotoksitas adalah *inhibition concentration* (IC_{50}). Nilai IC_{50} adalah konsentrasi suatu bahan uji yang mampu menghambat 50% pertumbuhan sel.

Pada penelitian ini sel HeLa di beri perlakuan dengan seri konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1250; dan 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ untuk vanililaseton dan divanililaseton, sedangkan perlakuan dengan vanillin isolasi hanya sampai 3,1250 $\mu\text{g/mL}$. Seri konsentrasi ini dipilih berdasarkan uji pendahuluan dengan cara membuat seri kadar dari 0 sampai 100 $\mu\text{g/mL}$. Namun perlakuan vanilin isolasi pada seri kadar tersebut belum mampu mencapai nilai IC_{50} dan menunjukkan aktivitas rendah.

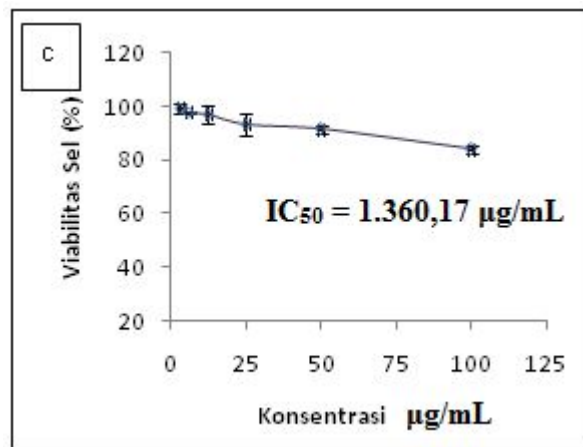
Perlakuan vanililaseton pada sel HeLa memperlihatkan bahwa senyawa ini dapat menurunkan viabilitas sel HeLa (Gambar 18a). Pada konsentrasi vanililaseton tertinggi yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh nilai rerata viabilitas sel sebesar 21,5203%, dengan nilai IC_{50} vanililaseton terhadap sel HeLa berdasarkan nilai probit adalah 51,68 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 1).



Gambar 18a. Pengaruh perlakuan vanililaseton terhadap viliabilitas sel HeLa



18b. Pengaruh perlakuan divanililaseton terhadap viabilitas sel HeLa

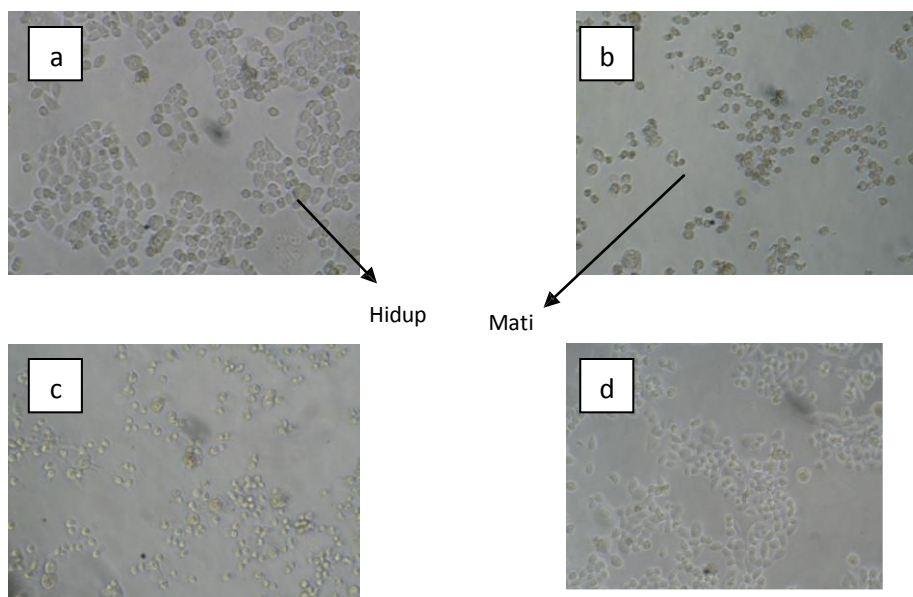


Gambar 18c. Pengaruh perlakuan vanillin isolasi terhadap viabilitas sel HeLa

Demikian juga senyawa divanililaseton juga mampu menurunkan viabilitas sel HeLa, bahkan lebih baik dibanding vanililaseton (Gambar 18b). Pada konsentrasi divanililaseton 100 µg/mL diperoleh nilai rerata viabilitas sel sebesar 1,2325% yang berarti bahwa hampir semua sel mengalami kematian (98,7675%). Berdasarkan perhitungan dengan analisis probit diperoleh nilai IC_{50} divanililaseton sebesar 10,26 µg/mL (Lampiran 2), termasuk kategori sangat aktif dan berpotensi sebagai senyawa antikanker.

Berbeda dengan senyawa vanililaseton dan divanililaseton yang menunjukkan aktivitas tinggi terhadap sel HeLa, senyawa vanillin isolasi kurang mampu menurunkan viabilitas sel HeLa (Gambar 18c). Pada penambahan vanillin isolasi tertinggi, yaitu sebesar 100 µg/mL viabilitas sel relatif masih tinggi, yaitu sebesar 83,9988 %. Berdasarkan perhitungan nilai probit, diperoleh

dengan IC_{50} yang cukup besar, yaitu 1.360,17 $\mu\text{g/mL}$ (Lampiran 3) yang menunjukkan senyawa ini memiliki aktivitas yang rendah terhadap sel HeLa.



Gambar 19. Morfologi Sel HeLa (a) tanpa perlakuan, (b) perlakuan dengan vaniliaseton 100 $\mu\text{g/mL}$ (c) perlakuan dengan divaniliaseton 100 $\mu\text{g/mL}$, dan (d) perlakuan dengan vanillin isolasi 100 $\mu\text{g/mL}$.

Gambaran pengaruh perlakuan senyawa vanililaseton, divanililaseton, dan vanilin isolasi terhadap morfologi sel HeLa ditunjukkan pada Gambar 19. Sel hidup dan sel yang mati memberikan penampakan yang berbeda pada pengamatan mikroskop. Sel yang mati akan terlihat hitam tanpa memberikan pancaran warna cerah karena telah hilangnya cairan sitoplasma. Sel hidup memberikan penampakan yang cerah karena masih adanya cairan sitoplasma yang meneruskan cahaya mikroskop. Pengamatan terhadap morfologi sel kanker HeLa tanpa perlakuan (normal) memperlihatkan sel berbentuk seperti daun yang melekat pada dasar sumuran *plate* kultur (Gambar 19a). Pada saat membelah sel tersebut berbentuk bulat. Setelah diberi perlakuan dengan vaniliaseton dan divaniliaseton, sel HeLa menunjukkan fenomena kematian (Gambar 19b dan 19c), yaitu sel menjadi rusak dan terlihat berwarna keruh. Selain itu dari kenampakannya juga terlihat penurunan jumlah sel berturut-turut dari sel tanpa perlakuan, sel dengan perlakuan menggunakan vanililaseton dan divanililaseton. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan vanililaseton dan divanililaseton terhadap morfologi sel. Pada perlakuan dengan vanillin isolasi menunjukkan bahwa senyawa ini

kurang berpengaruh terhadap morfologi sel HeLa. Banyak sel HeLa yang tampak hidup walaupun dengan penambahan konsentrasi vanillin aseton paling tinggi.

Bila dikaji lebih lanjut dari struktur ketiga senyawa tersebut menunjukkan bahwa adanya gugus hidroksi pada posisi *ortho* terhadap substituen metoksi dan gugus tak jenuh $\alpha\beta$ memberikan kontribusi yang besar pada aktivitas sitotoksik. Senyawa vanililaseton memiliki satu gugus hidroksi, satu gugus tak jenuh $\alpha\beta$, sedangkan senyawa divanililaseton memiliki 2 (dua) gugus hidroksi dan dua gugus tak jenuh α,β . Namun, senyawa vanilin isolasi tidak memiliki gugus tak jenuh α,β yang berakibat tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Penelitian pada senyawa kurkumin, menunjukkan bahwa keberadaan gugus hidroksi pada posisi *ortho* dan gugus β diketon memberikan sumbangan aktivitas yang besar pada kurkumin sebagai induser enzim-enzim fase dua seperti epoksida hidrolase, glutathion S-transferase (GST), NAD(P)H quinon reduktase (QR) yang berfungsi untuk proteksi terjadinya karsinogenesis (Dinkova and Talalay, 1999). Hubungan struktur dan aktivitas kurkumin sebelumnya juga dikemukakan oleh Majeed *et al.* (1995) terkait dengan gugus-gugus fungsional senyawa tersebut, yaitu sebagai berikut:

- a. Aktivitas antioksidan ditentukan oleh gugus hidroksi pada inti aromatik, hal ini telah dibuktikan pula dalam penelitian sifat antioksidasi kurkumin dan analognya dengan berbagai pendekatan yang telah membuktikan peran gugus hidroksi untuk sifat pereduksi (Da'i, 1998) dan penangkap radikal (Rianto, 1998) pada kurkumin dan analognya.
- b. Gugus β diketon dan ikatan rangkap berperan dalam aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antikanker dan antimutagenik. Dalam beberapa penelitian yang telah dilakukan, terlihat bahwa gugus β diketon yang telah diganti dengan analog siklopentanon tetap menunjukkan aktivitas biologis yang sama atau bahkan lebih baik dibandingkan dengan kurkumin, antara lain penelitian antiinflamasi (Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001) yang menunjukkan analog PGV-0 memiliki aktivitas lebih baik dibandingkan dengan kurkumin. Pengujian sifat sitotoksik terhadap sel Myeloma menunjukkan PGV-0 memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin (Nurrochmad, 2001).

Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik dari senyawa vaniliaseton, divaniliaseton dan vanilin sangat dipengaruhi oleh keberadaan gugus hidroksil dan senyawa karbonil tak jenuh $\alpha\beta$.

BAB V

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Vanilin hasil isolasi dapat dimodifikasi menjadi vanililaseton dan divanililaseton, tetapi belum dapat dimurnikan menjadi vanililasetofenon dalam kondisi basa. Modifikasi struktur vanillin hasil isolasi menjadi vanililasetofenon dapat dicoba dengan cara lain misalnya menggunakan kondisi asam.
2. Divanililaseton lebih aktif sebagai antioksidan daripada vanililaseton
3. Divanililaseton lebih berpotensi sebagai antikanker karena menunjukkan efek sitotoksik lebih tinggi dengan IC_{50} yang lebih rendah daripada IC_{50} vanililaseton.

DAFTAR PUSTAKA

- Bruice, P.Y., 2007, Organic Chemistry, Fifth edition, New York
- Cecep Virman, 2008, Teknik Inokulasi Mikoriza Arbuskula pada Bibit Vanili, *Buletin Teknik Pertanian*, Vol. 13 No. 2.
- Da'i, M., 1998, Pengaruh gugus β Diketon terhadap Daya Reduksi Kurkumin dan Turunannya Pada Ion Ferri, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P., 1999, Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of phase 2 detoxification enzymes, *Carcinogenesis*, **20**(5), 911-914.
- Dnyaneswar, J., Rekha B.N., Parag R. Gogate and Virendra K. Rathod, 2009, Extraction of Vanillin from Vanilla Pods : A Comparison Study of Conventional Soxhlet and Ultrasound Assisted Extraction, *Journal of Food Engineering*, Vol. 93, Issue 4, 421-426.
- Edy Meiyanto, 2008, Kanker, ccrcfarmasiugm.wordpress.com
- Eun Mi Ju, Si Eun Lee, Hyun Jin Wang and Jeong Hee Kimm, Antioxidant and Anticancer Activity of Extract from *Betula platphylla* var *japonica*, 2002, *Life Science*, Vol. 74, Issue 8, 1013-1026.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. and Kader, A.A., 2000, *J.Agric.Food.Chem.*, 48, 4581-4589.
- Indriana, S.M., 2006, Ekstraksi Vanili Secara Enzimatik dari Buah Vanili (*Vanilla Planifolia* Andrews) Segar, Sekolah Pascasarjana, Bogor.
- Juranic, Z. and Zizak, Z., 2005, Biological Activities of Berries : From Antioxidant Capacity to Anticancer effects, *BioFactors*, Vol. 23, No. 4, 207-211.
- Majeed, M., Badmaev, V., Shirakumar U., and Rajendran, R., 1995, *Curcuminoids antioxidant phytonutrients*, 3-80, NutriScience Publisher Inc., Piscataway, New Jersey.
- Meynarti S.D.I., Laba U. dan Endang H., 2010, Balittri.litbang.deptan.go.id
- Muhammad Da'i, Supardjan, AM., Meiyanto, E., dan Jenie UM., 2007, Isomers Geometric and Cytotoxic effect On T47D Cells of Curcumin Analogues PGV-0 and PGV-1, *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(1), 40-47
- Nurfina, A., Sri Atun and Retno, A., 2010, Anti Cancer Activity of Ampelopsin H from Stem Bark of *Hopea Odorata*, Proceeding PACCON, Ubon Ratchatani, Thailand, 116-119

- Nurrochmad, A., 2001, Sintesis Kurkumin, Bisdemetoksikurkumin, Bisdemetoksi-dehidroksikurkumin dan Pentagamavunon-0 serta Uji Kesitotoksikannya Terhadap Sel Mieloma dan Sel Mononuklear Normal Secara *In Vitro*, *Tesis*, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta.
- Pratt, D.E., 1992, Natural Antioxidant from Plant Material, di dalam M.T. Huang, C.T. Ho, dan C.Y.Lee, Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health H. American Society, Washington DC
- Ramadani, 2009, Pasca panen vanili, bertani.wordpress.com/2009/04/15
- Rianto, R.K., 1998, Daya Tangkap Radikal Superoksid dari Senyawa Siklovalon dan Derivat Lingkar Lima dan Rantai Lurus dengan Variasi Gugus Metoksi pada Cincin Aromatis, *Skripsi*, Fakultas Farmasi UGM.
- Silalahi, J., 2002, Anticancer and Health Protective Properties of Citrus Fruit Components, *Asia Pacific J Clin Nutr*, Vol 11, No. 1, 79-84
- Sri Atun, Retno, A., dan Sri Handayani, Rudyansyah and Garson, M., 2007, Identification and Antioxidant Activity Test of Some Compounds from Methanol Extract Peel of Banana (*Musa paradisiacal Linn*), *Indo.J.Chem.*, 7(1), 83-87.
- Sri Atun, Retno, A., T. Yoshiaki and N. Masatake, 2010, Phenolic Content and Cytotoxic Properties of Fermented black Soybeans (*Glycine soja*) Extract on Human HeLa-S3 and Raji Cell Lines, Proceeding PACCON, Ubon Ratchatani, Thailand, 689-691
- Sri Handayani dan Indyah, S.A., 2008, Synthesis of Hydroxyl Radical Scavengers from Benzalacetone and Its Derivatives, *Journal of Physical Chemistry*, Vol 19, No.2, 62-68.
- Sri Handayani, 2009, Synthesis and Activity Test of Two Asymmetric Dibenzalacetone as Potential Sunscreen Material, Proceeding of CBEE, Singapura
- Sri Handayani, Sabirin M., Chairil A. dan Sri Atun, 2009, Synthesis and Activity Tes as deoxyribose Degradation Inhibitor of Two Asymmetric Dibenzalacetone, Proceeding of XIX International Chemistry Seminar, Yogyakarta
- Sri Handayani, Sabirin M., Chairil A. dan Sri Atun, 2010, Synthesis and Activity Test as Antioxidant of Two Hydroxydibenzalacetones, Proceeding of PACCON, Ubon Ratchatani, Thailand
- Subiyarti, D., 2005, Pengaruh Penambahan Ekstrak Kulit Pisang Kepok Kuning (*Musa Balbisiana*) Terhadap Pencegahan Degradasi 2-deoksiribosa, *Skripsi*, FMIPA UNY

- Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001, *Buku III, Laporan Penelitian Bidang Farmakologi Proyek Molnas*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Trilaksani, W., 2003, *Antioksidan : Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*, Term Paper Graduate Program S3, IPB, Bogor.
- Unang Mansur, 2009, *Teknik Penggunaan Naungan Paranet untuk Meningkatkan Pertumbuhan dan Produksi Vanili (Vanilla planifoli Andrews)*, *Buletin Teknik Pertanian*, Vol. 14, No. 2, 76-79.
- V.E. Tarabanko, Yu.V. Chelbina, V.A. Sokolenko, N.V. Tarabanko, 2007, *A Study of Vanillin Extraction by Octylamine*, *Solvent Extraxtion and Ion Exchange*, Vol. 25, 99-107

1. Analisis Probit Perlakuan dengan Vanililaseton

Konsentrasi (ppm)	Viabilitas Sel (%)			Mean	Standar Deviasi
100	20,34	21,57	22,65	21,5203	1,15648
50	59,78	58,40	61,33	59,8356	1,46447
25	81,82	77,97	74,27	78,0175	3,77530
12,5	82,59	76,73	83,20	80,8423	3,57172
6,25	96,30	96,46	95,69	96,1479	0,40767
3,125	99,85	99,54	97,53	98,9728	1,25493
1,5625	104,31	100,31	95,53	100,0514	4,39700

```

PROBIT Persenviabilitas OF Subyek WITH Logkadar
/LOG NONE
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
    
```

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		6
Rejected	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	1
Control Gro p		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Logkadar	-1.890	.156	-12.120	.000	-2.196	-1.584
Intercept	3.229	.240	13.444	.000	2.989	3.470

a. PROBIT model: $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	12.085	4	.017 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

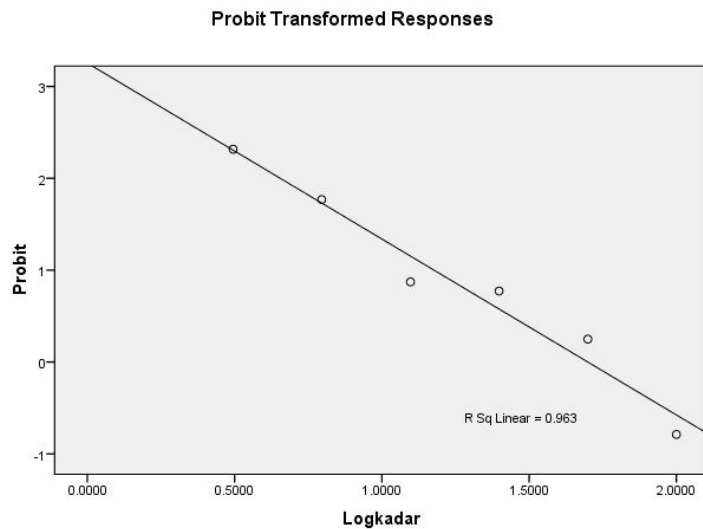
	Number	Logkadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	22	29.088	-7.568	.291
	2	1.699	100	60	50.722	9.113	.507
	3	1.398	100	78	72.147	5.870	.721
	4	1.097	100	81	87.619	-6.776	.876
	5	.796	100	96	95.774	.374	.958
	6	.495	100	99	98.910	.062	.989

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Logkadar		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	2.939	2.502	3.925
	0.02	2.795	2.397	3.688
	0.03	2.704	2.329	3.538
	0.04	2.635	2.279	3.425
	0.05	2.579	2.237	3.333
	0.06	2.531	2.202	3.255
	0.07	2.489	2.171	3.187
	0.08	2.452	2.143	3.126
	0.09	2.418	2.117	3.070
	0.1	2.387	2.094	3.020
	0.15	2.257	1.996	2.809
	0.2	2.154	1.916	2.644
	0.25	2.065	1.847	2.503
	0.3	1.986	1.783	2.378
	0.35	1.912	1.723	2.263
	0.4	1.843	1.664	2.156
	0.45	1.775	1.604	2.055
	0.5	1.709	1.543	1.959
	0.55	1.642	1.478	1.866
	0.6	1.575	1.408	1.775
	0.65	1.505	1.330	1.688
	0.7	1.431	1.241	1.602
	0.75	1.352	1.137	1.516
	0.8	1.263	1.015	1.429
	0.85	1.160	.864	1.335

0.9	1.031	.666	1.224
0.91	.999	.617	1.199
0.92	.965	.564	1.171
0.93	.928	.505	1.141
0.94	.886	.438	1.108
0.95	.838	.363	1.071
0.96	.782	.273	1.027
0.97	.714	.162	.974
0.98	.622	.014	.905
0.99	.478	-.221	.797

a. A heterogeneity factor is used.



Persamaan regresi probit:

$$\text{Probit (P)} = 3,229 - 1,890X$$

Penentuan nilai IC50

$$\text{Nilai probit } 50 = 1,709$$

Nilai IC 50 adalah antilog 1,709

Diperoleh : **51,68 ppm**

2. Analisis Probit Perlakuan dengan Divanilil Aseton

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas Sel (%)			Mean	Standar Deviasi
100	1,40	1,23	1,07	1,2325	0,16434
50	7,15	8,46	7,97	7,8609	0,66417
25	18,98	20,38	20,71	20,0219	0,91623
12,5	50,53	49,88	51,85	50,7532	1,00413
6,25	61,13	63,19	64,09	62,8047	1,51587
3,125	88,41	88,25	88,82	88,4963	0,29627
1,5625	94,74	91,29	91,04	92,3583	2,06734

```
PROBIT Persenviabilitas OF Subyek WITH Logkadar
/LOG NONE
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI
/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		7
Rejected	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Gro p		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	14	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Logkadar	-2.021	.125	-16.175	.000	-2.266	-1.776
Intercept	2.043	.141	14.448	.000	1.901	2.184

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	6.236	5	.284 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

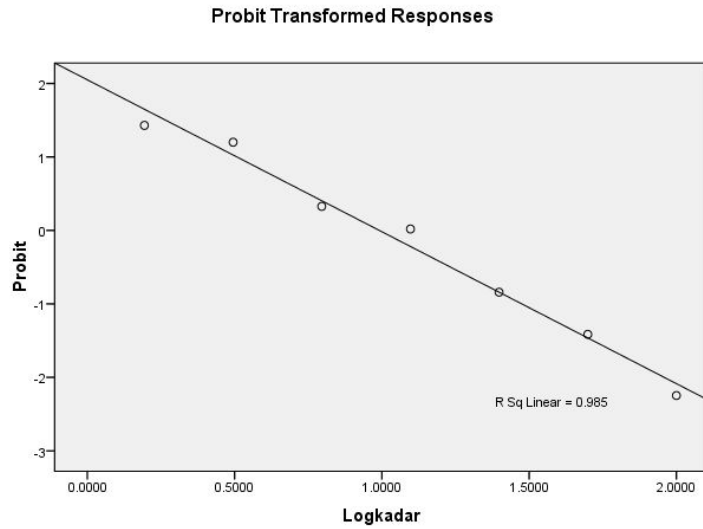
Cell Counts and Residuals

	Number	Logkadar	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	1	2.275	-1.042	.023
	2	1.699	100	8	8.201	-.340	.082
	3	1.398	100	20	21.681	-1.659	.217
	4	1.097	100	51	43.070	7.683	.431
	5	.796	100	63	66.780	-3.975	.668
	6	.495	100	88	85.136	3.361	.851
	7	.194	100	92	95.062	-2.704	.951

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Logkadar		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	2.161	2.027	2.330
	0.02	2.027	1.905	2.178
	0.03	1.941	1.828	2.081
	0.04	1.877	1.770	2.009
	0.05	1.824	1.722	1.950
	0.06	1.780	1.681	1.900
	0.07	1.741	1.646	1.857
	0.08	1.706	1.614	1.818
	0.09	1.674	1.585	1.782
	0.1	1.645	1.558	1.750
	0.15	1.523	1.446	1.615
	0.2	1.427	1.357	1.509
	0.25	1.344	1.279	1.419
	0.3	1.270	1.208	1.339
	0.35	1.201	1.142	1.266
	0.4	1.136	1.078	1.197
	0.45	1.073	1.015	1.132
	0.5	1.011	.952	1.069
	0.55	.948	.888	1.006
	0.6	.885	.822	.944
	0.65	.820	.753	.880
	0.7	.751	.680	.814
	0.75	.677	.599	.744

0.8	.594	.509	.667
0.85	.498	.403	.577
0.9	.377	.268	.466
0.91	.347	.235	.439
0.92	.315	.200	.410
0.93	.280	.161	.378
0.94	.241	.117	.342
0.95	.197	.067	.302
0.96	.144	.008	.254
0.97	.080	-.064	.196
0.98	-.005	-.160	.119
0.99	-.140	-.313	-.003



Persamaan regresi probit:
 Probit (P) = 2,043 - 2,021X
 Penentuan nilai IC50
 Nilai probit 50 = 1,011
 Nilai IC 50 adalah antilog 1,011
 Diperoleh : **10,256 ppm**

3. Analisis Probit Perlakuan dengan Vanili

Konsentrasi (ppm)	Viabilitas Sel (%)			Mean	Standar Deviasi
100	82,03	85,30	84,66	83,9988	1,73208
50	91,11	93,47	89,93	91,5003	1,80198
25	92,47	98,19	90,29	93,6479	4,07743
12.5	96,73	100,64	93,92	97,0962	3,37221
6,25	97,64	97,82	98,28	97,9129	0,32718
3,125	100,54	97,55	99,91	99,3345	1,57783

```

PROBIT Persenviabilitas OF Subyek WITH Logkonsentrasi
/LOG NONE
/MODEL PROBIT
/PRINT FREQ CI

/CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
    
```

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		6
Rejected	Missing	0
Number of Responses >		0
Number of Subjects		0
Control Gro p		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	17	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a Logkonsentrasi	-.916	.195	-4.702	.000	-1.298	-.534
Intercept	2.855	.312	9.144	.000	2.543	3.167

a. PROBIT model: $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.426	4	.980 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

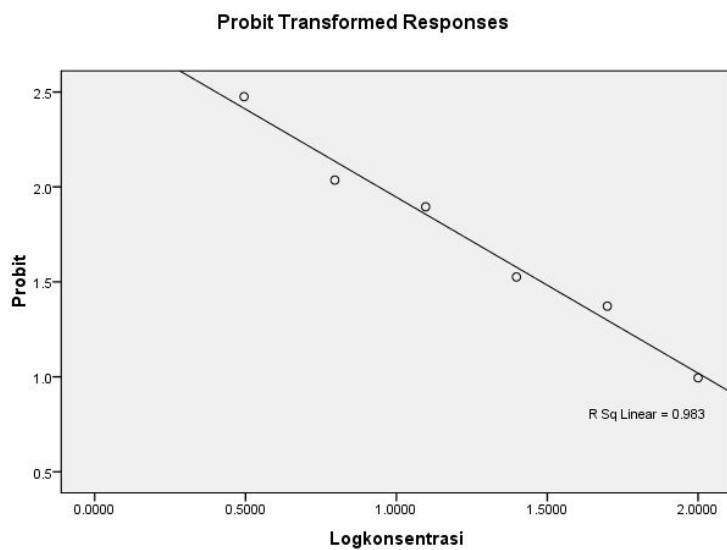
Cell Counts and Residuals

	Number	Logkonsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	84	84.677	-.678	.847
	2	1.699	100	92	90.292	1.208	.903
	3	1.398	100	94	94.228	-.580	.942
	4	1.097	100	97	96.784	.312	.968
	5	.796	100	98	98.324	-.411	.983
	6	.495	100	99	99.183	.151	.992

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Logkonsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	5.656	4.435	8.608
	0.02	5.358	4.224	8.099
	0.03	5.170	4.090	7.776
	0.04	5.027	3.990	7.532
	0.05	4.912	3.908	7.335
	0.06	4.814	3.838	7.166
	0.07	4.727	3.777	7.019
	0.08	4.650	3.722	6.887
	0.09	4.580	3.672	6.767
	0.1	4.515	3.626	6.656
	0.15	4.248	3.436	6.199
	0.2	4.035	3.285	5.835
	0.25	3.853	3.155	5.524
	0.3	3.689	3.038	5.244
	0.35	3.537	2.929	4.985

0.4	3.393	2.826	4.739
0.45	3.254	2.726	4.502
0.5	3.116	2.627	4.269
0.55	2.979	2.528	4.036
0.6	2.840	2.427	3.800
0.65	2.696	2.321	3.556
0.7	2.544	2.209	3.301
0.75	2.380	2.087	3.027
0.8	2.198	1.947	2.725
0.85	1.985	1.776	2.381
0.9	1.717	1.533	1.976
0.91	1.653	1.466	1.887
0.92	1.583	1.388	1.795
0.93	1.505	1.294	1.702
0.94	1.419	1.182	1.606
0.95	1.321	1.044	1.506
0.96	1.205	.871	1.399
0.97	1.063	.648	1.278
0.98	.874	.342	1.127
0.99	.577	-.152	.901



Persamaan regresi probit:
 Probit (P) = 2,855 - 0,916X
 Penentuan nilai IC50
 Nilai probit 50 = 3,116

Nilai IC 50 adalah antilog_{3,116}
Diperoleh : **1.360,17 ppm**