

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI SENYAWA KOMPLEKS Cu(II)-
KURKUMIN, SERTA UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI INHIBITOR
ENZIM LIPASE PANKREAS**

SKRIPSI



ACHMAD DIMAS HERMAWAN

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2016**

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI SENYAWA KOMPLEKS Cu(II)-
KURKUMIN, SERTA UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI INHIBITOR
ENZIM LIPASE PANKREAS**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia pada
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Oleh :


ACHMAD DIMAS HERMAWAN
NIM 081211531129


Tanggal Lulus : 28 Agustus 2016

Disetujui Oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. Sri Sumarsih, M.Si
NIP. 19600110 198810 2 001


Harsasi Setyawati, S.Si., M.Si
NIP. 19850519 201212 2 002

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-
kurkumin, serta Uji Aktivitasnya Sebagai Inhibitor Enzim
Lipase Pankreas

Penyusun : AchmadDimas Hermawan

NIM : 0811211531129

Pembimbing I : Dr. Sri Sumarsih, M.Si

Pembimbing II : Harsasi Setyawati S.Si, M.Si

Tanggal ujian : 28 Agustus 2016

Disetujui oleh :

Pembimbing I,



Dr. Sri Sumarsih, M.Si
NIP. 19600110 198810 2 001

Pembimbing II,



Harsasi Setyawati S.Si, M.Si
NIP. 19850519 201212 2 002

Mengetahui:

Ketua Departemen Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Airlangga



Dr. Purkan, M.Si
NIP. 19721116 199702 1 001

SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini, saya :

Nama : Achmad Dimas Hermawan
NIM : 081211531129
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan kegiatan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul :

Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin, serta Uji Aktivitasnya Sebagai Inhibitor Enzim Lipase Pankreas.

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah diterapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar benarnya.

Surabaya, 15 Juli 2016



Achmad Dimas Hermawan

NIM. 081211531129

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah hirobbil alamin atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penyusun dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan judul “**Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin, serta Uji Aktivitasnya Sebagai Inhibitor Enzim Lipase Pankreas**”. Penyusun menyadari bahwa penulisan naskah skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penyusun menyampaikan terimakasih kepada :

1. Ibu Dr. Sri Sumarsih, M.Si selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Harsasi Setyawati S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan saran, bimbingan, dan dukungan, sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Pak Drs. Handoko Darmokoesoemo, DEA selaku Dosen Wali yang senantiasa membimbing dan memberikan nasehat.
3. Bapak dan ibu dosen kimia yang senantiasa memberikan ilmu pengetahuan dan pelajaran dengan penuh kasih sayang.
3. Orang tua dan keluarga yang telah memberi kasih sayang dan dukungan baik secara moril dan materi.
4. Mahasiswa Kimia Universitas Airlangga angkatan 2012 yang memberi dukungan dan senantiasa menemani dalam menuntut ilmu.

Penyusun menyadari bahwa dalam penulisan naskah skripsi ini masih banyak kekurangan, sehingga penyusun mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi penulisan naskah skripsi ini selanjutnya. Penyusun berharap naskah skripsi ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang kesehatan.

Surabaya, 13 Juli 2016

Penyusun,

Achmad Dimas Hermawan

Hermawan, A. D., 2016, Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin, serta Uji Aktivitasnya Sebagai Inhibitor Enzim Lipase Pankreas, Skripsi dibawah bimbingan Dr. Sri Sumarsih, M.Si dan Harsasi Setyawati, S.Si., M.Si., Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Pada penelitian ini dilakukan sintesis, karakterisasi, dan uji aktivitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebagai inhibitor enzim lipase pankreas. Sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dari logam tembaga(II)-asetat hidrat dan ligan kurkumin hidrat dilakukan dengan perbandingan mol sebesar 1 : 2. Uji aktivitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan terhadap enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas dengan substrat *p*-NPP (*para*-nitrofenolpalmitat). Karakteristik senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki titik leleh sebesar 276 °C, panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 428 nm, ikatan logam dengan ligan ditunjukkan pada vibrasi ikatan Cu-O pada 479 cm^{-1} , dan momen magnet efektif (μ_{eff}) sebesar 2,613 BM. Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas dapat diperoleh presentase inhibisi sebesar 49,11 % pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$. Tipe penghambatan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase adalah tipe inhibisi campuran / nonkompetitif.

Kata kunci : Cu(II)-kurkumin, lipase, inhibitor, nonkompetitif

Hermawan, A. D., 2016, Synthesis, Characterization, and Activity Assay of Cu(II)-curcumin Complexes Compound As Inhibitor of Pancreatic Lipase Enzyme, This Studies Under Guidances Dr. Sri Sumarsih, M.Si and Harsasi Setyawati, S.Si., M.Si., Departement of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

This study done synthesis, characterization, and activity assay of Cu(II)-curcumin complexes compound as inhibitor of pancreatic lipase. Synthesis of Cu(II)-curcumin complexes compound that derived from cupro acetat hydrat as metal ion and curcumin hydrat as ligand with a mol ratio of 1 : 2. Activity assay of Cu(II)-curcumin complexes compound was conducted to against lipase enzyme from pancreatic lipase crude with p-NPP (para-nitrophenolpalmitate) substrate. Characteristic of this compounds include melting point at 276 °C, the maximum wavelength (λ_{max}) at 428 nm, as well as the bonding metal complexes with ligand show in the Cu-O bond vibration at 479 cm^{-1} , and effective magnetic moment (μ_{eff}) at 2,613 BM. The assay Cu(II)-curcumin complexes compound against activity of crude lipase pancreatic extract has 49,11 % inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$. The inhibition type of Cu(II)-curcumin complexes compound against lipase enzyme activity is mix or non-competitive inhibiton.

Keyword: Cu(II)-curcumin, lipase, inhibitor, non-competitive

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI	iii
SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Logam Cu(II)	6
2.2 Senyawa Kurkumin	7
2.3 Senyawa Kompleks	8
2.3.1 Struktur molekul senyawa kompleks	8
2.3.2 Sintesis senyawa kompleks	12
2.3.3 Karakteristik senyawa kompleks	13
2.3.3.1 Analisis titik leleh	13
2.3.3.2 Analisis panjang gelombang	14
2.3.3.3 Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan	15
2.3.3.4 Analisis momen magnet efektif dan sifat kemagnetan	16
2.4 Enzim Lipase	17
2.5 Kinetika Enzim	20
2.6 Inhibisi Enzim	21
BAB III METODE PENELITIAN	28
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	28
3.1.1 Tempat penelitian	28
3.1.2 Waktu penelitian	28
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	28
3.2.1 Bahan penelitian	28
3.2.2 Alat penelitian	29
3.3 Diagram Alir Penelitian	30
3.4 Prosedur Penelitian	30
3.4.1 Sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin	30

3.4.2	Karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	31
3.4.2.1	Penentuan titik leleh.....	31
3.4.2.2	Penentuan panjang gelombang maksimum.....	31
3.4.2.3	Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan.....	31
3.4.2.4	Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff}).....	32
3.4.3	Pembuatan larutan <i>buffer</i> fosfat.....	33
3.4.3.1	Pembuatan larutan <i>buffer</i> fosfat pH 6,0.....	33
3.4.3.2	Pembuatan larutan <i>buffer</i> fosfat pH 7,0.....	33
3.4.3.3	Pembuatan larutan <i>buffer</i> fosfat pH 8,0.....	34
3.4.4	Ekstraksi enzim lipase pankreas.....	34
3.4.4.1	Ekstraksi enzim lipase pankreas.....	34
3.4.4.2	Penentuan suhu dan pH optimum.....	35
3.4.5	Pembuatan kurva standard <i>p</i> -NP.....	36
3.4.5.1	Pembuatan larutan induk <i>p</i> -NP 20000 μM	36
3.4.5.2	Pembuatan larutan kerja <i>p</i> -NP.....	36
3.4.5.3	Penentuan kurva standart <i>p</i> -NP.....	37
3.4.6	Uji aktivitas inhibisi enzim lipase.....	37
3.4.6.1	Pembuatan substrat <i>p</i> -NPP 20000 μM	37
3.4.6.2	Pembuatan larutan campuran aseton : etanol (1 : 1).....	37
3.4.6.3	Uji aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas.....	38
3.4.6.4	Pembuatan larutan induk inhibitor enzim lipase 5000 ppm.....	39
3.4.6.5	Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas.....	40
3.4.7	Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	42
3.4.7.1	Uji aktivitas substrat <i>p</i> -NPP tanpa adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	42
3.4.7.2	Uji aktivitas substrat <i>p</i> -NPP dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	43
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		46
4.1	Sintesis Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin.....	46
4.2	Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin.....	47
4.2.1	Penentuan titik leleh.....	47
4.2.2	Penentuan panjang gelombang maksimum.....	48
4.2.3	Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan.....	51
4.2.4	Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff}).....	54
4.3	Uji Aktivitas Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin.....	57
4.3.1	Ekstraksi enzim lipase pankreas.....	57
4.3.1.1	Penentuan suhu dan pH optimum ekstrak kasar lipase pankreas.....	58
4.3.2	Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	61

4.3.2.1 Uji aktivitas ekstrak kasar lipase Pankreas	61
4.3.2.2 Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas	61
4.3.3 Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin	67
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	72
5.1 Kesimpulan	72
5.2 Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Struktur molekul senyawa kompleks.....	9
Tabel 2.2	Perbedaan sifat feromagnetik, paramagnetik, dan dimagnetik.....	17
Tabel 3.1	Perbandingan volume larutan induk <i>p</i> -NP dan <i>buffer</i> fosfat.....	37
Tabel 3.2	Campuran reagen pada uji aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas.....	38
Tabel 3.3	Campuran reagen pada uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	40
Tabel 3.4	Penambahan larutan <i>p</i> -NPP dan <i>buffer</i> fosfat pH 7,0 pada uji aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas tanpa adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	42
Tabel 3.5	Penambahan larutan <i>p</i> -NPP dan <i>buffer</i> fosfat pada uji aktivitas lipase dengan adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	44
Tabel 4.1	Hasil pengamatan uji titik leleh hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	47
Tabel 4.2	Hasil pengamatan analisis panjang gelombang (λ) hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	49
Tabel 4.3	Hasil pengamatan FTIR kurkumin, Cu(II)-kurkumin, dan data teoritis.....	52
Tabel 4.4	Hasil pengamatan analisis momen magnet efektif (μ_{eff}) hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	54
Tabel 4.5	Hasil pengamatan aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas pada berbagai suhu dan pH <i>buffer</i> fosfat.....	58
Tabel 4.6	Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas.....	62
Tabel 4.7	Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi substrat <i>p</i> -NPP terhadap laju reaksi awal ekstrak kasar lipase pankreas tanpa dan dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	68

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Tautomeri gugus keto enol pada kurkumin.....	7
Gambar 2.2	Mekanisme reaksi disosiasi pada reaksi substitusi senyawa kompleks.....	12
Gambar 2.3	Mekanisme reaksi <i>interchange</i> pada reaksi substitusi senyawa kompleks.....	13
Gambar 2.4	Mekanisme reaksi asosiasi pada reaksi substitusi senyawa kompleks.....	18
Gambar 2.5	Struktur enzim lipase.....	19
Gambar 2.6	(a) Mekanisme katalitik lemak (triasilgliserol) pada triad katalitik enzim lipase. (b) Struktur lipase pankreas saat berikatan dengan molekul lemak.....	20
Gambar 2.7	Mekanisme inhibitor kompetitif.....	22
Gambar 2.8	Kurva Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk pada inhibisi kompetitif.....	23
Gambar 2.9	Mekanisme inhibitor unkompetitif.....	24
Gambar 2.10	Kurva Lineweaver-Burk pada inhibisi unkompetitif.....	25
Gambar 2.11	Mekanisme inhibitor campuran dalam menghambat aktivitas enzim.....	26
Gambar 2.12	Kurva Lineweaver-Burk pada inhibisi campuran.....	27
Gambar 4.1	Logam Cu(II) dari Cu(asetat) ₂ hidrat, senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin hidrat, dan ligan kurkumin hidrat.....	46
Gambar 4.2	Pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	50
Gambar 4.3	Hasil FTIR ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	52
Gambar 4.4	Struktur molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	55
Gambar 4.5	Orbital molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	56
Gambar 4.6	Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipase dari ekstrak kasar lipase pankreas.....	59
Gambar 4.7	Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase dari ekstrak kasar lipase pankreas.....	60
Gambar 4.8	Grafik presentase inhibisi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas.....	63
Gambar 4.9	Kurva <i>Lineweaver-Burk</i> senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Spektra UV-VIS
- Lampiran 2. Hasil FTIR
- Lampiran 3. Hasil *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB)
- Lampiran 4. Kurva standart *p*-NP (*para*-nitrofenol)
- Lampiran 5. Penentuan suhu dan pH optimum ekstrak kasar lipase pankreas
- Lampiran 6. Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin
- Lampiran 7. Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas merupakan suatu kondisi medis dimana indeks massa tubuh (IMT) lebih besar dari $30 \text{ kg} / \text{m}^2$ yang ditandai dengan akumulasi jaringan lemak dalam tubuh (Puska *et al.*, 2003). Penyebab terbesar timbulnya obesitas adalah kelebihan asupan nutrisi, kurangnya aktivitas fisik, faktor kejiwaan (psikologi), faktor genetik, dan kelainan kesehatan (Lau *et al.*, 2007). Peningkatan konsumsi dan tingkat oksidasi dari karbohidrat dan protein dapat menyebabkan peningkatan timbulnya obesitas. Di sisi lain, masalah yang timbul akibat ketidakseimbangan asupan nutrisi juga dapat ditentukan dari keseimbangan antara konsumsi lemak dan tingkat oksidasi lemak (Wang *et al.*, 2002). Metabolisme lemak jenuh terkait dengan akumulasi jaringan adiposa, sedangkan lemak tidak jenuh terkait dengan peningkatan pengeluaran energi dan pengurangan asupan energi. Mekanisme hidrolisis lemak melibatkan enzim lipase (Coelho *et al.*, 2011). Oleh sebab itu, pengembangan agen anti-obesitas dapat dilakukan melalui mekanisme penghambatan aktivitas enzim lipase pankreas pada proses hidrolisis lemak (Lunagariya *et al.*, 2014).

Lipase (triasilgliserol asilhidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalis reaksi hidrolisis dan sintesis ester yang terbentuk dari gliserol dan asam lemak rantai panjang (Sherma *et al.*, 2001). Lipase dapat ditemukan pada eukariot seperti jamur, tumbuhan, dan hewan, serta prokariot seperti bakteri. Namun, sumber

lipase terbesar diperoleh dari bakteri, dan jamur (Kojima *et al.*, 2003). Pada sel eukariot, lipase terlibat dalam berbagai metabolisme lipid termasuk hidrolisis lemak, penyerapan asam lemak, pemulihan, dan metabolisme lipoprotein (Sherma *et al.*, 2001). Lipase pada mamalia dibedakan menjadi tiga kelompok enzim lipolitik yaitu lipase yang terisolasi untuk saluran pencernaan, lipase jaringan, dan lipase susu. Jaringan mamalia dan organ yang mengandung lipase meliputi jantung, otak, otot, pembuluh darah, ginjal, limpa, paru-paru, hati, jaringan lemak, dan plasma (Salleh *et al.*, 2006). Pada tumbuhan, lipase ditemukan dalam cadangan jaringan energi (Sherma *et al.*, 2001).

Pengaturan aktivitas enzim dapat dilakukan dengan melibatkan beberapa mekanisme pengikatan enzim terhadap kofaktor (Baruch *et al.*, 2004). Pengaturan pada penghambatan aktivitas enzim menjelaskan proses pengikatan enzim terhadap penambahan senyawa lain yang mempengaruhi laju reaksi katalisis enzim (Fontes *et al.*, 2000). Penelitian penghambatan enzim lipase dapat memberikan pemahaman terbaru mengenai modifikasi inhibitor. Inhibitor enzim mempengaruhi laju aktivitas enzim terhadap substrat, sehingga modifikasi inhibitor dapat meningkatkan aplikasi bioteknologi enzim (Ruiz *et al.*, 2006).

Beberapa contoh senyawa bahan alam yang telah diketahui memiliki aktivitas inhibitor enzim lipase adalah senyawa dari golongan alkaloid, karotenoid, polifenol, glikosida, saponin, dan terpenoid (Linugariya *et al.*, 2014). Golongan saponin, flavonoid, dan polifenol dapat menghambat aktivitas enzim lipase dalam konsentrasi tinggi (Mohamed *et al.*, 2014). Pada golongan polisakarida seperti kitosan dapat menghambat hidrolisis triolein oleh enzim lipase pankreas secara *in*

vitro (Han *et al.*, 2005). Senyawa polifenol dari golongan kurkuminoid secara alami dapat menurunkan akumulasi lemak dalam tubuh (Pongchaidecha *et al.*, 2009). Potensi anti-obesitas pada golongan kurkuminoid adalah mengatur metabolisme energi dan menurunkan konsentrasi lipid secara intraseluler (Alappat *et al.*, 2010). Golongan kurkuminoid seperti kurkumin dapat menekan angiogenesis pada pertumbuhan jaringan adiposa (Ejaz *et al.*, 2009). Angiogenesis merupakan proses fisiologi pembentukan pembuluh darah baru dari jaringan pembuluh darah yang sudah ada. Angiogenesis mengawali berbagai pembentukan jaringan baru termasuk jaringan adiposa, sehingga angiogenesis berperan penting dalam adipogenesis dan lipogenesis. Golongan kurkuminoid mengatur faktor-faktor transkripsi yang berperan dalam adipogenesis dan lipogenesis (Aggarwal *et al.*, 2010). Penghambatan aktivitas lipase pankreas oleh kurkumin masih menjadi topik penelitian yang menarik sebagai dasar anti-obesitas pada senyawa tersebut.

Kurkumin ((1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien -3,5-dion) adalah salah satu senyawa anti-oksidan yang memiliki dua gugus fenolik dan gugus β -keton dengan ikatan rangkap terkonjugasi (Itokawa *et al.*, 2008). Kurkumin merupakan senyawa polifenol utama yang ditemukan pada tanaman kunyit (*Curcuma longa* L.). Kunyit (*Curcuma longa* L.) termasuk dalam anggota dari keluarga jahe (*Zingiberaceae*) (Archana *et al.*, 2010). Kurkumin memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi, anti-oksidan, anti-HIV, efek kemopreventif kanker dan anti-kanker prostat (Itokawa *et al.*, 2008). Penelitian Archana dkk (2010) menyatakan bahwa kurkumin dapat menekan angiogenesis dalam penghambatan pertumbuhan jaringan adiposa, sehingga dapat bertindak sebagai anti-obesitas.

Pada penelitian ini, penghambatan aktivitas enzim lipase oleh kurkumin akan ditingkatkan dengan mengkomplekskan kurkumin dengan logam tembaga (Cu). Logam tembaga (Cu) dipilih karena merupakan mikronutrien penting sebagai kofaktor katalitik dalam berbagai *metalloenzymes* (Bertinato *et al.*, 2004). Tembaga diperlukan oleh lebih dari 30 protein, termasuk superoksida dismutase, seruloplasmin, lisil oksidase, sitokrom c oksidase, tirosinase, dan dopamin- β -hidroksilase (Arredondo *et al.*, 2005). Penelitian Karadzic dkk (2006) menyatakan bahwa ion Cu(II) dapat menghambat aktivitas enzim lipase yang diperoleh dari hasil isolasi *Pseudomonas aeruginosa*.

Pada penelitian ini dipelajari pengaruh senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan dengan perbandingan mol logam-ligan sebesar 1 : 2 (Zhao *et al.*, 2012). Hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dikarakterisasi titik leleh dengan menggunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*, panjang gelombang maksimumnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR, dan momen magnet efektif dan sifat kemagnetannya dengan menggunakan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB). Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan uji aktivitasnya terhadap ekstrak lipase pankreas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut,

1. Bagaimana sintesis dan karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin?

2. Apakah senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin mampu menghambat aktivitas ekstrak lipase pankreas?
3. Apakah tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka dapat diperoleh tujuan penelitian sebagai berikut,

1. Melakukan sintesis dan karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin
2. Menguji apakah senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin mampu menghambat aktivitas ekstrak lipase pankreas
3. Mempelajari tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan pengetahuan mengenai potensi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dalam menghambat aktivitas ekstrak lipase pankreas. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas.

BAB II

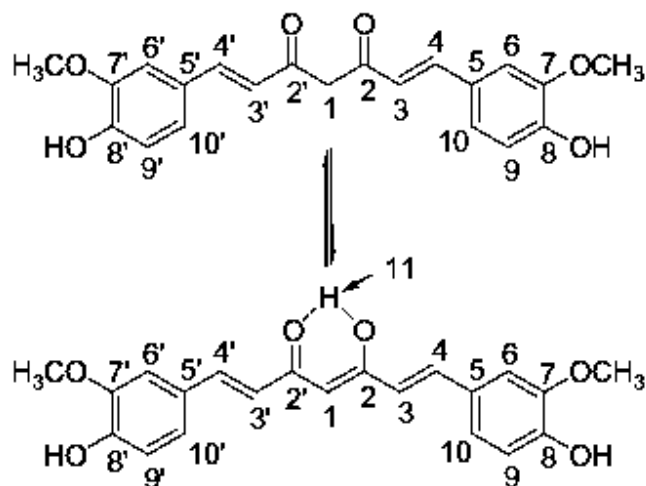
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Logam Cu(II)

Logam tembaga (Cu) merupakan mikronutrien penting sebagai kofaktor katalitik dalam berbagai *metalloenzymes* (Bertinato *et al.*, 2004). Tembaga diperlukan oleh lebih dari 30 protein, termasuk superoksida dismutase, seruloplasmin, lisil oksidase, sitokrom c oksidase, tirosinase, dan dopamin- β -hidroksilase (Arredondo *et al.*, 2005). Pada sistem intraseluler, tembaga (Cu) dibutuhkan oleh mitokondria untuk menghasilkan Cu (A) dan intramembran Cu (B) pada sitokrom c oksidase. Tembaga dibutuhkan dalam jaringan trans-Golgi untuk menghasilkan superoksida dismutase (Robinson *et al.*, 2010). Penelitian Karadzic dkk (2006) menyatakan bahwa Cu(II) dapat menghambat aktivitas enzim lipase dari hasil isolasi *Pseudomonas aeruginosa*. Kompleks Cu-protein pada superoksida dismutase dapat melokalisasi ke mitokondria, sistem sekresi, dan inti sel. Pada sistem sel tanaman, kloroplas membutuhkan kompleks Cu-protein untuk plastosianin. Pada sel prokariotik, kompleks tersebut dapat ditemukan di dalam membran sel dan periplasma bakteri (Robinson *et al.*, 2010). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan logam Cu sebagai logam pusat pada kompleks Cu(II)-kurkumin.

2.2 Senyawa Kurkumin

Kurkumin ((1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien - 3,5-dion) adalah salah satu senyawa anti-oksidan yang memiliki dua gugus fenolik dan gugus β -keton dengan ikatan rangkap terkonjugasi (Itokawa *et al.*, 2008). Gugus 1,3 diketon pada kurkumin mampu membentuk tautomeri keto-enol, sehingga dapat menghasilkan senyawa kompleks yang stabil. Kurkumin dapat mendonorkan dua pasangan elektron bebas (PEB) yang digunakan untuk mengkhelat logam (Zhao *et al.*, 2010). Struktur molekul kurkumin yang dapat membentuk tautomeri pada gugus keto-enol dapat dilihat pada Gambar 2.1,



Gambar 2.1 Tautomeri gugus keto enol pada kurkumin ((1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien -3,5-dion) berlangsung pada gugus 1,3 diketon (Zhao *et al.*, 2010).

Kurkumin merupakan senyawa polifenol utama yang ditemukan pada tanaman kunyit (*Curcuma longa* L.). Kunyit (*Curcuma longa* L.) termasuk dalam anggota dari keluarga jahe (*Zingiberaceae*) (Archana *et al.*, 2010). Kurkumin memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi, anti-oksidan, anti-HIV, efek kemopreventif kanker dan anti-kanker prostat (Itokawa *et al.*, 2008).

Penelitian Archana dkk (2010) menyatakan bahwa kurkumin dapat menekan angiogenesis dalam penghambatan pertumbuhan jaringan adiposa, sehingga dapat bertindak sebagai anti-obesitas. Penelitian Bradford (2013) mengungkapkan bahwa kurkumin dapat berinteraksi secara aktif dengan menekan pertumbuhan jaringan adiposa. Pada jaringan adiposa, kurkumin dapat menginduksi ekspresi adiponektin. Adiponektin merupakan agen anti-inflamasi utama yang disekresi oleh adiposit. Adiposit merupakan sel-sel penyusun jaringan adiposa. Kurkumin memiliki efek penghambat diferensiasi adiposit, meningkatkan potensi anti-obesitas, dan menurunkan efek negatif dari obesitas. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan kurkumin sebagai ligan organik pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin karena struktur molekul dan potensi anti-obesitas alami yang dimilikinya.

2.3 Senyawa Kompleks

2.3.1 Struktur molekul senyawa kompleks

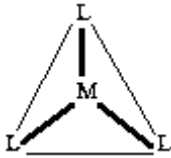
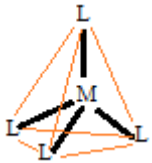
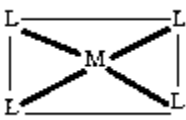
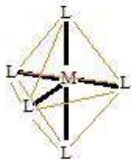
Senyawa kompleks atau senyawa koordinasi merupakan senyawa yang terdiri atas logam pusat sebagai penerima pasangan elektron bebas (PEB) dan ligan sebagai pendonor pasangan elektron bebas (PEB). Struktur molekul senyawa kompleks dapat diperoleh dari beberapa faktor interaksi yaitu,

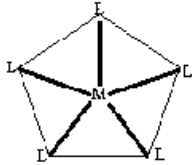
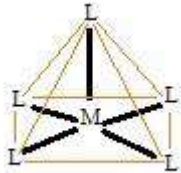

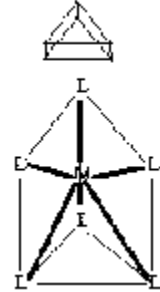

1. Pertimbangan teori *valence shell electron-pair repulsion* (VSEPR)
2. Jumlah elektron pada orbital *d* yang memberikan dampak pada bentuk geometri struktur senyawa kompleks
3. Pengaruh sterik ligan disekitar ion logam

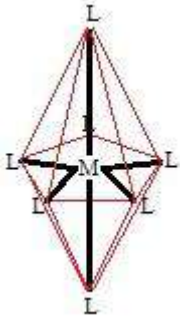
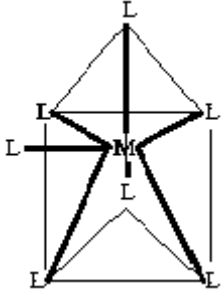
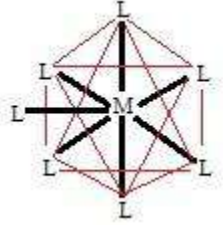
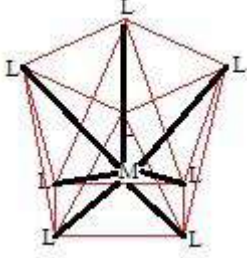
4. Pengaruh bentuk kristal yang dihasilkan oleh ukuran ion dan bentuk geometri senyawa kompleks.

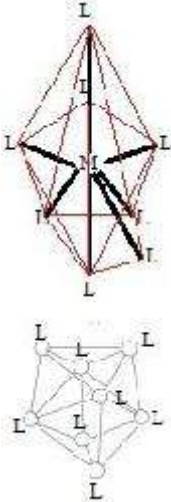
Struktur senyawa kompleks dapat membentuk struktur geometri yang berbeda-beda tergantung jumlah koordinasi logam-ligan (Miessler *et al.*, 2014). Struktur molekul senyawa kompleks yang dibentuk oleh jumlah koordinasi logam-ligan dapat dilihat pada Tabel 2.1,

Tabel 2.1 Struktur molekul senyawa kompleks yang dibentuk oleh jumlah koordinasi logam-ligan (Miessler *et al.*, 2014)

No	Jumlah Koordinasi	Bentuk molekul	Bentuk geometri
1	1	$L - M$	Linier
2	2	$L - M - L$	Linier
3	3		Segi tiga
4	4		tetrahedral
5			Segi empat planar
6	5		Segitiga bipiramid

7			Pentagonal
8	5		Piramida segi empat
9			Oktahedral
10	6		Trigonal prismatic
11			Trigonal antiprismatic

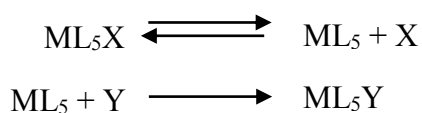
12			Pentagonal bipiramid
13	7		<i>Capped</i> trigonal prismatik
14			<i>Capped</i> oktahedral
15	8		Segi empat antiprismatik

16			dodekahedral
----	--	---	--------------

Keterangan : L = Ligan ; M = *Metal* (logam)

2.3.2 Sintesis senyawa kompleks

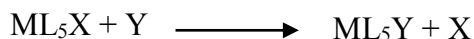
Pada sintesis senyawa kompleks, reaksi yang terjadi secara umum adalah reaksi substitusi. Reaksi substitusi terjadi pergantian ligan pada senyawa kompleks awal untuk membentuk senyawa kompleks baru. Reaksi substitusi terdapat tiga macam mekanisme reaksi yaitu disosiasi, *interchange*, dan asosiasi. Reaksi disosiasi terjadi mekanisme pembentukan intermediet (ML_5) yang merupakan hasil dari pelepasan ligan X pada senyawa kompleks awal (ML_5X). Intermediet tersebut menerima ligan Y untuk membentuk senyawa kompleks baru (ML_5Y). Mekanisme reaksi disosiasi dapat dilihat pada Gambar 2.2,



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi disosiasi pada reaksi substitusi senyawa kompleks (Miessler *et al.*, 2014).

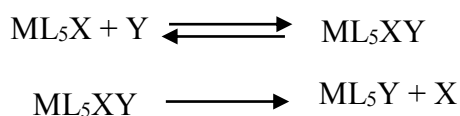
Reaksi *interchange* tidak terjadi mekanisme pembentukan senyawa intermediet.

Mekanisme reaksi *interchange* dapat dilihat pada Gambar 2.3,



Gambar 2.3 Mekanisme reaksi *interchange* pada reaksi substitusi senyawa kompleks (Miessler *et al.*, 2014).

Reaksi asosiasi terjadi mekanisme pembentukan intermediet (ML_5XY) yang merupakan hasil dari penggabungan ligan Y dengan senyawa kompleks awal (ML_5X). Kemudian, ligan Y akan mengusir ligan X sehingga terbentuk senyawa kompleks baru (ML_5Y). Mekanisme reaksi disosiasi dapat dilihat pada Gambar 2.4,



Gambar 2.4 Mekanisme reaksi asosiasi pada reaksi substitusi senyawa kompleks (Miessler *et al.*, 2014).

2.3.3 Karakterisasi senyawa kompleks

Karakterisasi senyawa kompleks dilakukan untuk mengetahui karakteristik senyawa kompleks. Karakteristik senyawa kompleks dapat ditentukan melalui beberapa analisis seperti analisis titik leleh, serapan dan panjang gelombang, analisis gugus fungsi, ikatan logam dengan ligan, momen magnet efektif, dan sifat kemagnetan.

2.3.3.1 Analisis titik leleh

Pada penelitian ini, analisis titik leleh dilakukan dengan menggunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*. Analisis titik leleh merupakan salah satu pengujian yang relatif murah dan mudah untuk menentukan kemurnian suatu senyawa. Pertama kristal senyawa berukuran kecil diletakkan di dalam *cover slip Fischer-John Melting Point Apparatus* sedemikian rupa hingga tepat berada dibawah daerah pemanas. Proses diamati mulai pertama kali meleleh hingga

meleleh sempurna. Tingkat kemurnian suatu senyawa dapat ditentukan dari rentang kenaikan suhu yaitu sebesar 1-2 °C. Apabila kenaikan suhu yang diperoleh lebih dari 2 °C atau kurang dari 1 °C, maka kristal senyawa yang diamati dikatakan tidak murni. Titik leleh yang terukur pada senyawa yang akan diidentifikasi untuk menentukan kemurnian senyawa tersebut. Pada senyawa organik, titik leleh senyawa yang telah terisolasi dilaboratorium dapat ditentukan titik lelehnya dengan membandingkan titik leleh yang diperoleh dari data ilmiah (*Acros, Baker, Sigma-Aldrich*, dan lainnya) (LeFevre, 2004).

2.3.3.2 Analisis panjang gelombang

Pada penelitian ini, analisis panjang gelombang senyawa kompleks digunakan spektrofotometri *Ultraviolet-Visible* (UV-Vis). Prinsip yang digunakan adalah spektrofotometri UV-Vis. Teknik analisis spektrofotometri UV-Vis memiliki beberapa kelebihan antara lain analisis lebih sederhana, cepat, dan cukup spesifik berlaku untuk jumlah kecil dari senyawa. Analisis spektrofotometri UV-Vis dapat diperoleh analisis kuantitatif dan kualitatif. Pada analisis kuantitatif, hukum dasar yang digunakan adalah hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa absorbansi sinar berkurang secara eksponensial seiring dengan bertambahnya konsentrasi dan ketebalan bahan. Persamaan matematis hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam persamaan (2.1),

$$A = a \cdot B \cdot C \quad (2.1)$$

Keterangan : A = Absorbansi
a = Absorbsivitas molar
B = Tebal kuvet (cm)
C = Konsentrasi

Panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang dimiliki oleh suatu senyawa sangat khas dan tidak dimiliki senyawa lain, sehingga dapat digunakan sebagai analisis kualitatif (Bahera, *et al.*, 2012).

Susunan alat spektrofometer UV-Vis yaitu suatu sumber sinar yang dapat berupa lampu wolfram (sumber sinar tampak) dan lampu deuterium (sumber sinar ultraviolet). Sumber sinar dipancarkan melalui monokromator yang akan mengubah sinar polikromatis menjadi monokromatis. Sinar yang telah melewati monokromator akan diteruskan dan diserap oleh suatu larutan dengan konsentrasi tertentu dalam kuvet. Berkas sinar yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor. Sinar yang diserap sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel, sehingga konsentrasi zat dalam sampel dapat diketahui (Triyati, 1985).

2.3.3.3 Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan

Analisis gugus fungsi dan ikatan logam-ligan senyawa kompleks dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Keuntungan analisis spektrofotometri FTIR adalah waktu analisis relatif singkat, dapat menganalisis sampel dalam bentuk gas, cair, dan padat, dan dapat menentukan struktur molekul senyawa hingga ikatan antar atom. Analisis Spektrofotometri FTIR didasarkan adanya vibrasi atom akibat adanya sinar inframerah yang mengenai molekul sampel. Pada spektrum FTIR terdapat tiga daerah pembacaan yaitu dekat, menengah, dan jauh. Pada daerah pembacaan menengah ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) merupakan daerah yang digunakan untuk pembacaan berbagai gugus fungsi pada senyawa organik. Daerah pembacaan jauh (13.000-

4000 cm^{-1}) yang merupakan adanya vibrasi atom dasar seperti C-H, N-H, dan O-H. Akan tetapi, spektrum yang dihasilkan pada daerah ini biasanya sangat lemah, terjadi tumpang tindih, dan intensitasnya menurun, sehingga kurang diminati untuk analisis kualitatif senyawa organik. Daerah pembacaan dekat (400 - 100 cm^{-1}) memberikan informasi mengenai vibrasi atom dengan massa lebih besar, vibrasi kerangka molekul, torsio molekul, dan vibrasi kisi kristal. Pada vibrasi atom dengan massa lebih besar dapat bermanfaat dalam mengkarakterisasi senyawa yang mengandung atom halogen, senyawa organologam, senyawa anorganik, dan senyawa kompleks logam organik (Stuart, 2004). Hukum dasar yang mengatur analisis spektrofotometri FTIR adalah hukum Hooke yang dinyatakan dalam persamaan (2.2),

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (2.2)$$

Keterangan : ν = Frekuensi getaran molekul

k = konstanta gaya

m = Massa molekul

2.3.3.4 Analisis momen magnet efektif dan sifat kemagnetan

Penentuan momen magnet efektif dan analisis sifat kemagnetan menggunakan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB). Prinsip kerja MSB adalah adanya elektron tidak berpasangan pada orbital molekul sampel yang mengakibatkan adanya momen magnet apabila diberikan induksi magnet dari luar. Pada MSB terdapat sepasang magnet yang dipasang mengapit tempat sampel, sehingga antara sampel dengan salah satu magnet akan menghasilkan pembelokan momen magnet pada sampel akibat adanya medan magnet yang tidak searah yang

disebut fototransistor. Pada sampel terdapat tiga sifat magnetik yaitu feromagnetik, paramagnetik, dan diamagnetik (Matthey, 2004). Perbedaan masing-masing sifat dapat dilihat pada Tabel 2.2,

Tabel 2.2 Perbedaan sifat feromagnetik, paramagnetik, dan diamagnetik (Matthey, 2004)

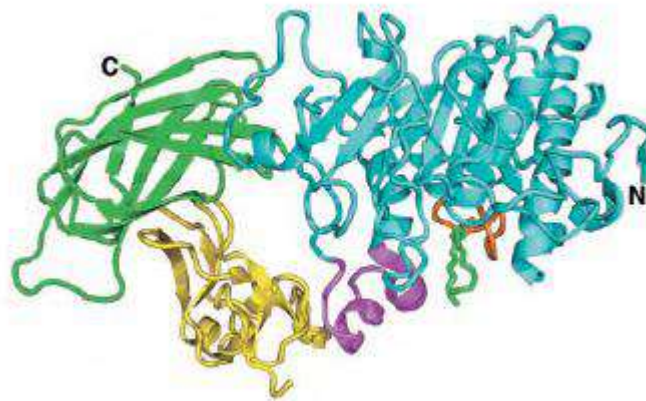
No	Sifat kemagnetan	Kecenderungan	Contoh senyawa
1	Feromagnetik	Sampel ditarik kuat oleh bagian medan magnet non-homogen. Perubahan dari feromagnetik menjadi paramagnetik mengikuti hukum temperatur Currie	Fe, Co, Ni dan beberapa logam <i>alloy</i> seperti Pt/Bi, pirit
2	Paramagnetik	Sampel ditarik lemah oleh bagian medan magnet non-homogen. Sifat paramagnetik pada sampel mengikuti hukum temperatur Currie	Hampir seluruh logam transisi, unsur golongan lantanida, aktinida, dan beberapa spesi radikal seperti O ₂ dan NO
3	Diamagnetik	Sampel ditolak oleh bagian medan magnet non-homogen. Sifat diamagnetik pada sampel mengikuti hukum temperatur normal	Hampir seluruh unsur dan senyawa yang tidak termasuk dalam senyawa yang bersifat paramagnetik, dan feromagnetik.

Kekuatan sifat magnetik suatu bahan dapat ditentukan dari besarnya momen magnet efektif. Momen magnet efektif dipengaruhi oleh adanya elektron tidak berpasangan pada orbital molekul (Matthey, 2004).

2.4 Enzim Lipase

Lipase (triasilgliserol asilhidrolase, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalis dalam reaksi hidrolisis dan sintesis ester yang terbentuk dari gliserol dan asam lemak rantai panjang (Sherma *et al.*, 2001). Lipase dapat ditemukan pada

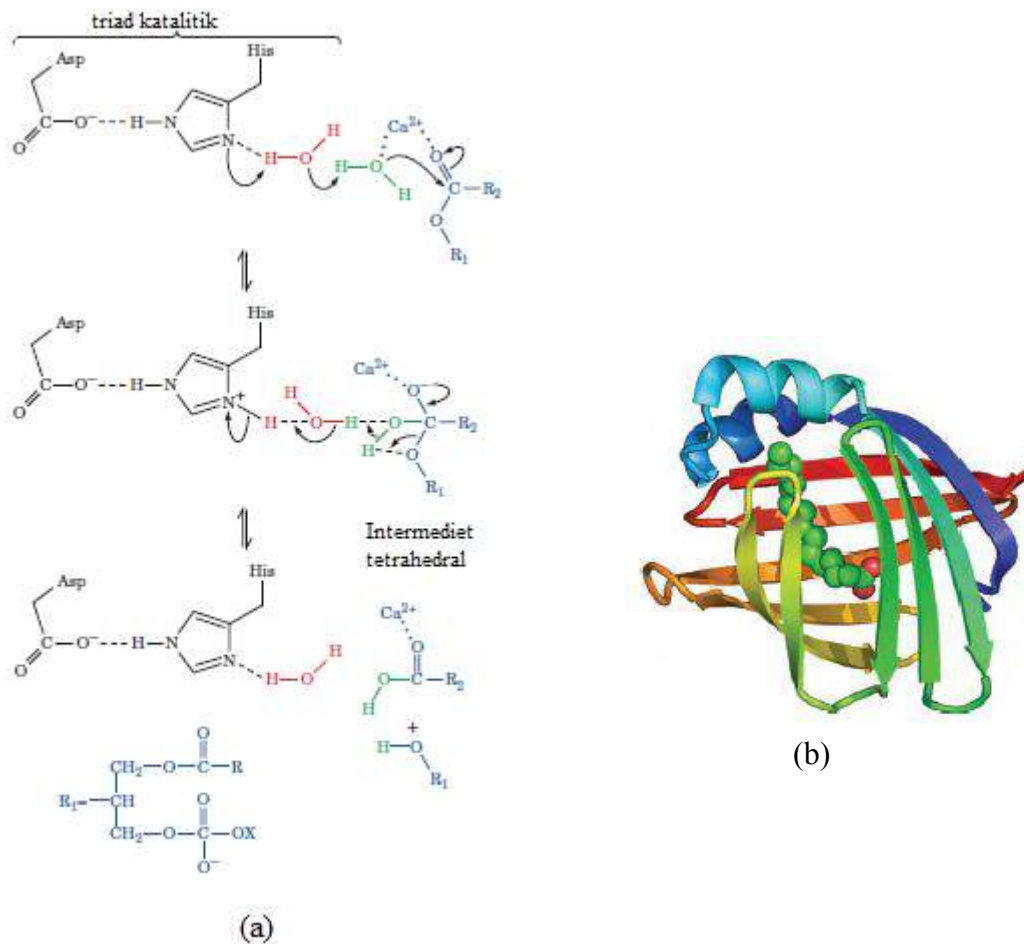
eukariot seperti jamur, ragi, tumbuhan, dan hewan, serta prokariot seperti bakteri. Namun, sumber terkaya diperoleh dari bakteri, jamur, dan ragi (Kojima *et al.*, 2003). Pada sel eukariot, lipase terlibat dalam berbagai metabolisme lipid termasuk pemecahan lemak, penyerapan, pemulihan, dan metabolisme lipoprotein (Sherma *et al.*, 2001). Lipase pada mamalia dibedakan menjadi tiga kelompok enzim lipolitik yaitu lipase yang terisolasi untuk saluran pencernaan, lipase jaringan, dan lipase susu. Jaringan mamalia dan organ yang mengandung lipase meliputi jantung, otak, otot, pembuluh darah, ginjal, limpa, paru-paru, hati, jaringan lemak, dan plasma (Salleh *et al.*, 2006). Pada tumbuhan lipase ditemukan dalam cadangan jaringan energi (Sherma *et al.*, 2001). Struktur enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 2.5,



Gambar 2.5 Struktur enzim lipase dengan ujung N pada sisi berwarna biru dan ujung C pada sisi hijau (Voet *et al.*, 2011).

Enzim lipase pada metabolisme lemak dihasilkan dari pankreas. Lipase yang diperoleh dari pankreas memiliki sisi katalitik yang berperan pada hidrolisis lemak. Sisi katalitik lipase terdiri atas tiga asam amino yang disebut triad katalitik. Triad katalitik pada lipase terdiri atas serin (Ser153), histidin (His264) dan asam aspartat (Asp177) (Lowe, 1997). Mekanisme katalitik lemak (triasilgliserol) pada

triad katalitik enzim lipase dan struktur lipase pankreas saat berikatan dengan molekul lemak dapat dilihat masing-masing pada Gambar 2.6(a) dan 2.6(b),



Gambar 2.6 (a) Mekanisme katalitik lemak (triasilgliserol) pada triad katalitik enzim lipase. (b) Struktur lipase pankreas saat berikatan dengan molekul lemak seperti asam palmitat (Voet *et al.*, 2011).

Enzim lipase yang diperoleh dari pankreas disebut stepsin. Hidrolisis stepsin tidak berjalan spontan, tetapi bertingkat menghasilkan digliserida dan monogliserida. Digliserida dihidrolisis menjadi dua molekul monogliserida. Monogliserida dihidrolisis lebih lanjut menghasilkan gliserol dan asam lemak. Kemampuan hidrolisis lemak oleh stepsin bekerja pada suhu optimum 36–40 °C dan pH optimum 7,5–8,5. (Sumardjo, 2006).

2.5 Kinetika Enzim

Kinetika enzim dapat menjelaskan reaksi katalisis enzim, dimana secara umum reaksi tersebut terdiri atas enzim (E) dan substrat (S) seperti pada persamaan (2.3),



Reaksi katalitik enzim dapat menghasilkan produk (P), kompleks enzim-substrat (ES) dan enzim (E).

Persamaan umum laju reaksi enzim dapat dilihat pada persamaan (2.4),

$$V = \frac{d[P]}{dt} = K_2[ES] \quad (2.4)$$

sedangkan laju reaksi pembentukan kompleks enzim-substrat (ES) dapat dilihat pada persamaan (2.5),

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES] \quad (2.5)$$

Pada keadaan *steady state*, dimana laju pembentukan kompleks enzim-substrat (ES) berada dalam keadaan stabil seperti pada persamaan (2.6),

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (2.6)$$

Karena total enzim yang terdapat dalam reaksi enzim merupakan jumlah dari $[E]$ dan $[ES]$, maka persamaan *steady state* dapat dilihat dari persamaan (2.7),

$$\begin{aligned} [E]_T &= [E] + [ES] \\ K_1([E]_T - [ES])[S] &= (K_{-1} + K_2)[ES] \\ [ES](K_{-1} + K_2 + K_1[S]) &= K_1[E]_T[S] \end{aligned} \quad (2.7)$$

Konstanta Michaelis-Menten (K_M) dapat dinyatakan pada persamaan (2.8),

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (2.8)$$

sehingga konsentrasi kompleks enzim-substrat ($[ES]$) dapat dinyatakan pada persamaan (2.9),

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (2.9)$$

Laju reaksi mula-mula merupakan laju reaksi yang diukur sebelum 10% substrat diubah menjadi produk. Laju reaksi mula-mula (V_o) dapat dinyatakan pada persamaan (2.10),

$$V_o = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=t_s} = K_2[ES] = \frac{K_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (2.10)$$

dimana t_s merupakan waktu saat awal *steady state* (milidetik setelah $t = 0$). Laju reaksi maksimum (V_{maks}) terjadi ketika semua sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat dan terdapat kelebihan konsentrasi substrat (Voet *et al.*, 2011). Laju reaksi maksimum (V_{maks}) dapat dinyatakan pada persamaan (2.11),

$$V_{maks} = K_2[E]_T \quad (2.11)$$

Persamaan umum Michaelis-Menten dapat dinyatakan pada persamaan (2.12),

$$V_o = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.12)$$

Persamaan linier untuk kinetika enzim dikenal juga dengan persamaan Lineweaver-Burk yang dinyatakan pada persamaan (2.13),

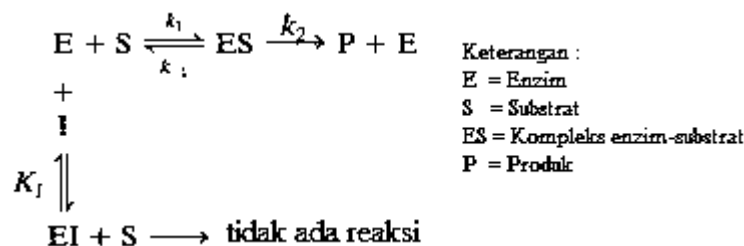
$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_M}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.13)$$

2.6 Inhibisi Enzim

Inhibitor merupakan senyawa kimia yang dapat menghambat aktivitas enzim baik berupa inhibisi kompetitif, unkompetitif, dan campuran. Tipe inhibitor antara lain,

1. Inhibisi kompetitif

Inhibisi aktivitas enzim melalui mekanisme inhibisi kompetitif terjadi ketika substrat (*S*) dan inhibitor (*I*) bersaing untuk dapat mengikat sisi aktif enzim. Hal ini disebabkan karena bentuk inhibitor menyerupai substrat. Kompleks *EI* yang terbentuk tidak dapat melakukan reaksi katalitik dan tidak dapat membentuk produk. Akibatnya, terjadi penurunan jumlah enzim yang berikatan dengan substrat dan jumlah produk yang terbentuk dari hasil reaksi enzim dengan substrat (Voet *et al.*, 2011). Mekanisme inhibisi kompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.7,



Gambar 2.7 Mekanisme inhibitor kompetitif dalam menginhibisi aktivitas enzim (Voet *et al.*, 2011).

Pada mekanisme tersebut terdapat nilai konstanta kesetimbangan K_I yang dapat dinyatakan pada persamaan (2.14),

$$K_I = \frac{[E] + [I]}{[EI]} \quad (2.14)$$

Konsentrasi enzim yang terdapat pada mekanisme inhibisi kompetitif merupakan konsentrasi total enzim ($[E]_T$). Konsentrasi total enzim dapat dinyatakan pada persamaan (2.15),

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] \quad (2.15)$$

Konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dapat dinyatakan pada persamaan (2.16),

$$K_M = \frac{[E] + [S]}{[ES]} \quad (2.16)$$

sehingga, konsentrasi $[EI]$, $[ES]$ dan $[E]_T$ dapat dinyatakan pada persamaan (2.17), (2.7), dan (2.8),

$$[EI] = \frac{[E]+[I]}{K_1} = \frac{K_M[ES][I]}{[S]K_1} \quad (2.17)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M\left(1+\frac{1}{K_1}\right)+[S]} \quad (2.18)$$

$$[E]_T = [ES] \left\{ \frac{K_M}{[S]} \left(1 + \frac{1}{K_1}\right) + 1 \right\} \quad (2.19)$$

Laju reaksi mula-mula (V_o) dapat dinyatakan pada persamaan (2.20),

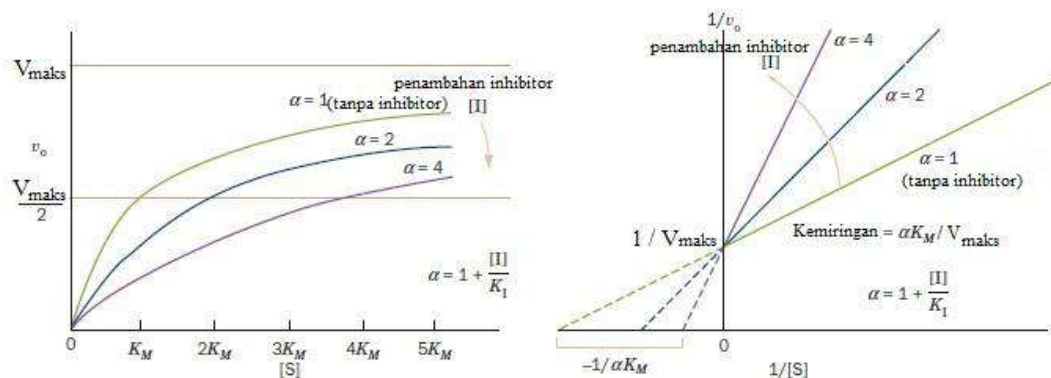
$$V_o = K_2[ES] = \frac{K_2[E]_T[S]}{K_M\left(1+\frac{1}{K_1}\right)+[S]} \quad (2.20)$$

Laju reaksi maksimum (V_{maks}) dapat dinyatakan pada persamaan (2.21),

$$V_o = \frac{V_{maks}[S]}{aK_M + [S]} \quad (2.21)$$

Karena, $V_{maks} = K_2[E]_T$ dan $a = \left(1 + \frac{1}{K_1}\right)$

Penentuan tipe inhibisi kompetitif dapat dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim terkadap variasi konsentrasi substrat (Voet *et al.*, 2011). Hubungan aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat dapat dilihat dari kurva *Michaelis-Menten* dan *Lineweaver-Burk* pada Gambar 2.9,



Gambar 2.8 Kurva *Michaelis-Menten* dan *Lineweaver-Burk* pada inhibisi kompetitif (Voet *et al.*, 2011).

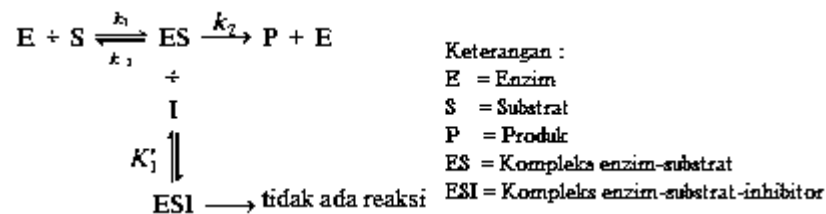
Persamaan *Lineweaver-Burk* pada inhibisi kompetitif dapat dinyatakan pada persamaan (2.22),

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{aK_M}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2.22)$$

Pada persamaan tersebut terdapat kemiringan / *slope* adalah aK_M/V_{maks} dan *intercept* adalah $1/[S]$ untuk $-1/K_M$ dan $1/V_o$ untuk $1/V_{maks}$ (Voet *et al.*, 2011).

2. Inhibisi unkompetitif

Inhibisi unkompetitif pada enzim terjadi apabila inhibitor (*I*) mengikat kompleks enzim dan substrat (*ES*). Kompleks *ESI* yang terbentuk tidak dapat membentuk produk (*P*) (Voet *et al.*, 2011). Mekanisme inhibisi unkompetitif dapat dilihat pada Gambar 2.9,



Gambar 2.9 Mekanisme inhibitor unkompetitif dalam menginhibisi aktivitas enzim (Voet *et al.*, 2011).

Pada mekanisme tersebut terdapat nilai konstanta kesetimbangan K'_1 yang dapat dinyatakan pada persamaan (2.23),

$$K'_1 = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (2.23)$$

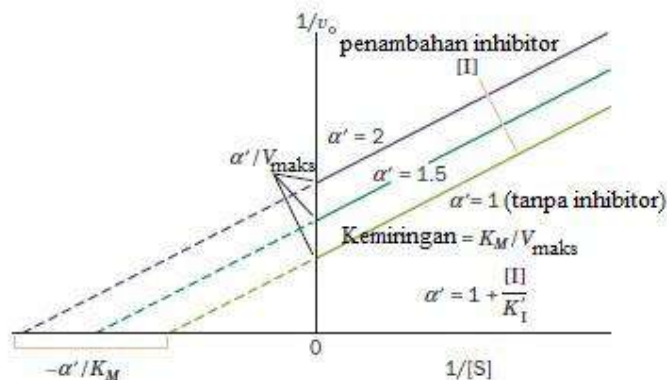
Persamaan *Michaelis-Menten* pada inhibisi unkompetitif dapat dinyatakan pada persamaan (2.24),

$$V_o = \frac{V_{maks}[S]}{K_M + a'[S]} \quad (2.24)$$

dimana, $a' = 1 + \frac{[I]}{K'_1}$

Penentuan tipe inhibisi unkompetitif dapat dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat. Hubungan aktivitas enzim terhadap

variasi konsentrasi substrat dapat dilihat dari kurva *Michaelis-Menten* dan *Lineweaver-Burk* pada Gambar 2.10,.



Gambar 2.10 Kurva *Lineweaver-Burk* pada inhibisi unkompetitif (Voet *et al.*, 2011).

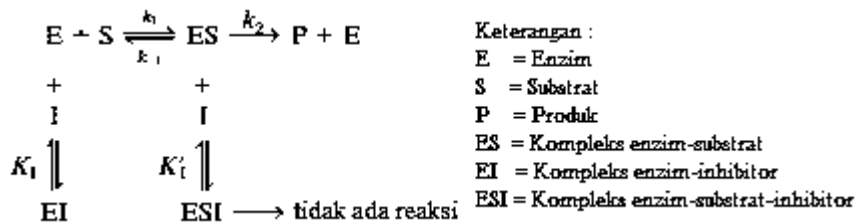
Persamaan *Lineweaver-Burk* pada inhibisi unkompetitif dapat dinyatakan pada persamaan (2.25),

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{K_M}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{a'}{V_{maks}} \quad (2.25)$$

Pada persamaan tersebut terdapat kemiringan / *slope* adalah aK_M/V_{maks} dan *intercept* adalah $1/[S]$ untuk $-a'/K_M$ dan $1/V_o$ untuk a'/V_{maks} (Voet, *et al.*, 2011).

3. Inhibisi campuran

Inhibisi campuran terjadi apabila inhibitor (*I*) mengikat sisi aktif pada enzim (*E*) maupun pada kompleks enzim dan substrat (*ES*) (Voet *et al.*, 2011). Mekanisme inhibisi campuran dapat dilihat pada Gambar 2.11,



Gambar 2.11 Mekanisme inhibitor campuran dalam menginhibisi aktivitas enzim (Voet *et al.*, 2011).

Pada mekanisme tersebut terdapat nilai konstanta kesetimbangan K'_1 dan yang dapat dinyatakan pada persamaan (2.26),

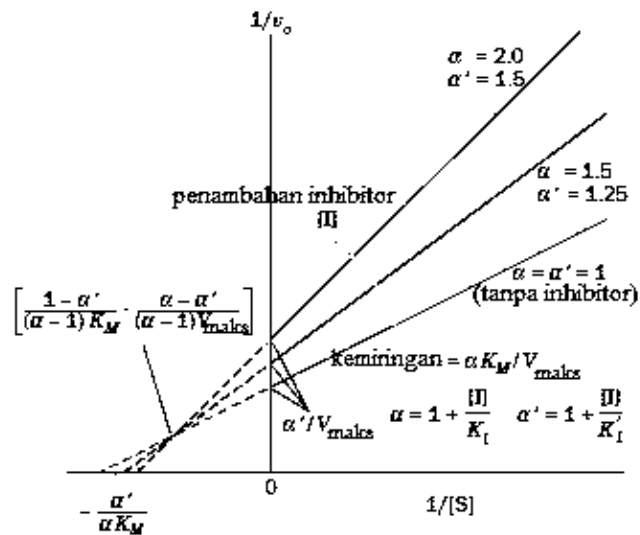
$$K'_1 = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \text{ dan } K_1 = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2.26)$$

Persamaan *Michaelis-Menten* pada inhibisi campuran dapat dinyatakan pada persamaan (2.27),

$$V_o = \frac{V_{maks}[S]}{aK_M + a'[S]} \quad (2.27)$$

dimana, $a' = 1 + \frac{[I]}{K'_1}$ dan $a = \left(1 + \frac{1}{K_1}\right)$

Penentuan tipe inhibisi campuran dapat dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat. Hubungan aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat dapat dilihat dari kurva *Michaelis-Menten* dan *Lineweaver-Burk* pada Gambar 2.12,



Gambar 2.12 Kurva *Lineweaver-Burk* pada inhibisi campuran (Voet *et al.*, 2011).

Persamaan *Lineweaver-Burk* pada inhibisi campuran dapat dinyatakan pada persamaan (2.28),

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{maks}} \quad (2.28)$$

Pada persamaan tersebut terdapat kemiringan / *slope* adalah $\alpha K_M / V_{maks}$ dan *intercept* adalah $1/[S]$ untuk $-\alpha' / \alpha K_M$ dan $1/v_o$ untuk α' / V_{maks} (Voet *et al.*, 2011). Pada setiap inhibitor terdapat nilai konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) yang sangat khas dan nilainya berbeda dengan inhibitor lain.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu Penelitian

3.1.1 Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Anorganik dan Analitik, Laboratorium Organik dan Biokimia, Universitas Airlangga, Surabaya. Analisis spektrofotometri FTIR dilakukan di Departemen Material dan Metalurgi, Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.

3.1.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai bulan Juni 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin berkualias p.a antara lain senyawa kurkumin hidrat ((1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) -1,6-heptadien-3,5-dion) (*Merck*), tembaga(II) asetat hidrat ($\text{CuC}_2\text{H}_8\text{O}_5$) (*Merck*), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), dan akuades.

Bahan yang digunakan pada karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin antara lain dimetil sulfoksida ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_4\text{S}$), dan KBr anhidrat.

Bahan yang digunakan pada ekstraksi enzim lipase pankreas antara lain pankreas sapi, sukrosa p.a., natrium dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4) p.a. (*Sigma Aldrich*), natrium hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) p.a. (*Sigma Aldrich*), dan akuades .

Bahan yang digunakan pada uji penghambatan aktivitas enzim lipase antara lain ekstrak enzim lipase pankreas sapi, substrat *para*-nitrofenilpalmitat (*p*-NPP) p.a (*Sigma Aldrich*), serbuk *para*-nitrofenol (*p*-NP) p.a (*Sigma Aldrich*), isopropanol, dimetil sulfoksida ($C_2H_6O_4S$), aseton (CH_3COCH_3) p.a., etanol (C_2H_5OH) p.a., dan akuades.

3.2.2 Alat penelitian

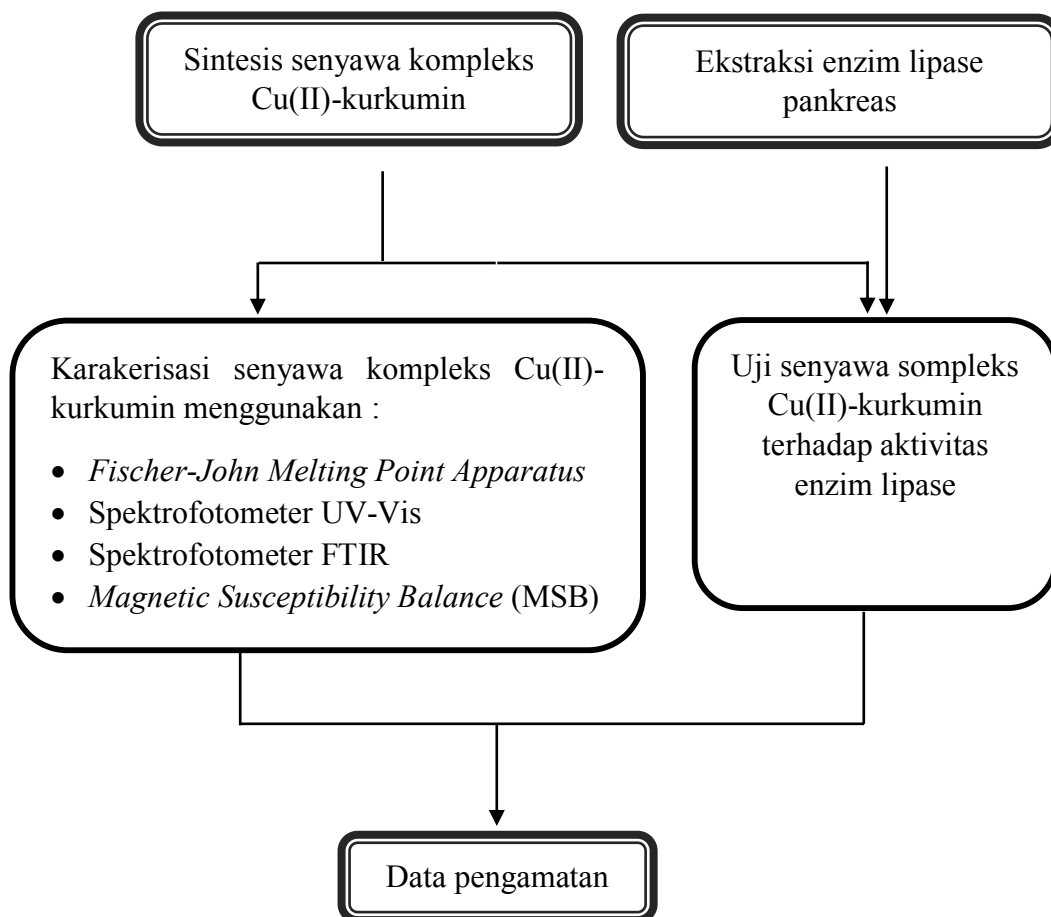
Alat yang digunakan pada sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin antara lain neraca analitik, kertas saring, *sentrifuge*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, kaca arloji, termometer, corong *buchner*, aluminium *foil*, seperangkat alat refluks dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium Kimia.

Karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin menggunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*, spektrofotometer *Shimadzu Ultraviolet –Visible* (UV-Vis) 1800, spektrofotometer *Jasco FTIR 5300*, dan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB).

Alat yang digunakan pada ekstraksi enzim lipase antara lain neraca analitik, blender, *sentrifuge*, gelas beaker, dan kain.

Uji penghambatan aktivitas enzim lipase antara lain menggunakan tabung *eppendorf*, *waterbath*, *hotplate*, mikropipet ukuran 1-1000 μ L, dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium Kimia.

3.3 Diagram Alir Penelitian



3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada sintesis Cu(II)-kurkumin digunakan metode perbandingan mol logam : ligan sebesar 1 : 2 (Zhao *et al.*, 2010). Padatan kurkumin hidrat sebesar 0,7360 gram (2 mmol) dilarutkan dengan etanol p.a hingga tepat larut. Logam tembaga(II) asetat hidrat sebesar 0,1995 gram (1 mmol) dilarutkan dengan etanol p.a hingga tepat larut. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan direfluks selama 2 jam pada suhu 60 °C. Produk yang telah diperoleh disaring dengan memakai corong *buchner* dan dicuci dengan campuran etanol dan akuades dingin untuk

menghilangkan sisa logam Cu(II) dan ligan kurkumin. *Powder* yang terbentuk dikeringkan dalam desikator selama semalam.

3.4.2 Karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

3.4.2.1 Penentuan titik leleh

Senyawa kompleks hasil sintesis Cu(II)-kurkumin ditentukan titik lelehnya dengan menggunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*. Hal ini bertujuan untuk menentukan adanya senyawa kompleks yang telah terbentuk, dimana senyawa kompleks memiliki titik leleh yang berbeda dengan logam dan ligan. Uji titik leleh juga dapat digunakan untuk mengamati kemurnian senyawa yang telah disintesis. Senyawa dianggap murni jika jarak titik leleh senyawa hasil sintesis dari mulai leleh hingga meleleh seluruhnya maksimal 2 °C.

3.4.2.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Karakterisasi senyawa kompleks hasil sintesis Cu(II)-kurkumin ditentukan panjang gelombang maksimumnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebanyak 0,0040 gram (10^{-3} M) dilarutkan dengan 5 mL dimetil sulfoksida. Larutan induk kompleks Cu(II)-kurkumin diambil 0,05 mL dengan mikropipet dan ditambahkan dimetil sulfoksida hingga 5 mL (10^{-5} M). Kemudian diukur panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) pada rentang panjang gelombang 200-900 nm (Refat, 2013).

3.4.2.3 Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan

Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR. Senyawa hasil sintesis sebanyak 2 mg digerus dengan 10 mg KBr anhidrat dalam keadaan bebas air. Kemudian campuran

dimasukkan kedalam *Press Holder*, divakumkan dan ditekan beberapa saat hingga terbentuk *pellet*. *Pellet* tersebut diukur vibrasi molekulnya pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} (Zhao *et al.*, 2010).

3.4.2.4 Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff})

Pada penentuan momen magnet efektif (μ_{eff}) dilakukan dengan menggunakan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB). Pengukuran ini dilakukan pada suhu kamar (T) 303 K. Setelah itu, alat dihidupkan dan dibiarkan selama 10 menit. Alat dikondisikan sedemikian rupa, sehingga penunjuk R menampilkan nilai 0. Tabung MSB kosong ditimbang dan dinyatakan sebagai m_0 (gram). Kemudian tabung tersebut dimasukkan kedalam sel uji dan harga pada penunjuk R dinyatakan sebagai R_0 . Selanjutnya tabung MSB diisi sampel hingga ketinggian diatas 2 cm dan ditimbang kembali, beratnya dinyatakan sebagai m_1 (gram). Ketinggian sampel dalam tabung ditentukan sebagai l (cm). Tabung berisi sampel dimasukkan kedalam alat MSB dan harga pembacaannya dicatat sebagai R_1 (Mubaroh, 2008).

Nilai suseptibilitas massa (χ_g) dihitung berdasarkan data hasil pengukuran.

Nilai suseptibilitas massa (χ_g) ditentukan berdasarkan persamaan (3.1),

$$\chi_g = \frac{C_{bal} \times l \times (R_1 - R_0)}{10^9 \times (m_1 - m_0)} \quad (3.1)$$

C_{bal} merupakan konstanta kalibrasi sebesar 3,39.

Nilai suseptibilitas molar (χ_m) ditentukan dari hasil perhitungan nilai suseptibilitas massa (χ_g). Nilai suseptibilitas molar (χ_m) dapat diperoleh melalui persamaan (3.2),

$$\chi_m = \chi_g \times Mr_{\text{Cu(II)-kurkumin}} \quad (3.2)$$

Nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) ditentukan dari hasil perhitungan nilai suseptibilitas molar (χ_m). Nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) ditentukan dari persamaan (3.3),

$$\mu_{\text{eff}} \text{ (BM)} = 2,83 \sqrt{[(\chi_m - \Delta) \times T]} \quad (3.3)$$

Keterangan :

μ_{eff} = Nilai momen magnet efektif (BM)

χ_m = Nilai suseptibilitas molar

Δ = Faktor koreksi

T = Suhu pengukuran (303 K)

3.4.3 Pembuatan larutan *buffer* fosfat

3.4.3.1 Pembuatan larutan *buffer* fosfat pH 6,0

Padatan NaH_2PO_4 hidrat sebanyak 3,12 gram dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan NaH_2PO_4 dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan NaH_2PO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Sebanyak 3,56 gram Na_2HPO_4 hidrat dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan Na_2HPO_4 dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan Na_2HPO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Kemudian, sebanyak 6 mL NaH_2PO_4 0,2 M diambil dan ditambahkan 94 mL Na_2HPO_4 0,2 M dalam labu ukur 100 mL.

3.4.3.2 Pembuatan larutan *buffer* fosfat pH 7,0

Padatan NaH_2PO_4 hidrat sebanyak 3,12 gram dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan NaH_2PO_4 dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan NaH_2PO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Sebanyak 3,56 gram Na_2HPO_4 hidrat dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan Na_2HPO_4 dipindahkan kedalam labu

ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan Na_2HPO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Kemudian, sebanyak 38 mL NaH_2PO_4 0,2 M diambil dan ditambahkan 62 mL Na_2HPO_4 0,2 M dalam labu ukur 100 mL.

3.4.3.3 Pembuatan larutan *buffer* fosfat pH 8,0

Padatan NaH_2PO_4 hidrat sebanyak 3,12 gram dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan NaH_2PO_4 dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan NaH_2PO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Sebanyak 3,56 gram Na_2HPO_4 hidrat dilarutkan dengan akuades dalam gelas beker 100 mL. Larutan Na_2HPO_4 dipindahkan kedalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan Na_2HPO_4 dengan konsentrasi 0,2 M. Kemudian, sebanyak 86 mL NaH_2PO_4 0,2 M diambil dan ditambahkan 14 mL Na_2HPO_4 0,2 M dalam labu ukur 100 mL.

3.4.4 Ekstraksi enzim lipase pankreas

3.4.4.1 Ekstraksi enzim lipase pankreas

Pankreas sapi yang telah dipisahkan jaringan lemak dicuci bersih dan dipotong kubus 0,635 cm. Setelah itu, pankreas ditambahkan sukrosa dingin (4 °C) 0,01 M dan disimpan pada suhu -20 °C. Ekstraksi dan pemurnian enzim dilakukan pada suhu dingin.

Pada ekstraksi lipase pankreas kasar, pankreas sebesar 500 gram ditambahkan dengan 1000 mL sukrosa dingin (4 °C) 0,01 M selama 90 detik dalam pada suhu 2 °C. Pankreas kemudian diblender selama 5 menit. Ekstrak disaring melalui beberapa lapisan kain tipis untuk menghilangkan sisa jaringan lemak. Larutan campuran yang telah bersih diambil 15 mL dan disentrifugasi 4500 rpm

pada suhu -4°C selama 30 menit sebanyak 3 kali pengulangan. Larutan pada lapisan tengah diambil dari tabung *sentrifuge* tanpa mengikutsertakan lapisan lemak pada bagian atas dan endapan pada lapisan bawah. Hasil ekstraksi tersebut merupakan ekstrak lipase pankreas (Shahani *et al.*, 1975).

3.4.4.2 Penentuan suhu dan pH optimum ekstrak lipase pankreas

Volume reaksi pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas adalah sebesar 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Ekstrak lipase pankreas sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang telah diisi 25 μL larutan *p*-NPP 20000 μM dan ditambahkan larutan *buffer* fosfat sebanyak 875 μL . Kemudian, larutan campuran diinkubasi dalam penangas air selama 20 menit dengan variasi suhu sebesar 27°C , 37°C , dan 47°C , dan pH *buffer* fosfat sebesar 6, 7, dan 8.

Masing-masing larutan campuran ditambahkan larutan aseton : etanol dingin sebanyak 350 μL bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Selanjutnya, larutan tersebut diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Perlakuan ini dilakukan secara duplo. Sebagai larutan kontrol digunakan ekstrak lipase pankreas yang telah diinaktifkan dengan perlakuan yang sama. Inaktifasi ekstrak lipase pankreas dilakukan dengan menambahkan larutan aseton : etanol dingin pada ekstrak lipase pankreas sebelum penambahan larutan *p*-NPP. Nilai absorbansi yang ditentukan merupakan pengurangan dari nilai absorbansi rata-rata dengan nilai absorbansi kontrol (Kanwar *et al.*, 2005). Nilai aktivitas tertinggi merupakan nilai aktivitas pada suhu dan pH optimum ekstrak lipase pankreas.

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis perhitungan menggunakan persamaan (3.4) dan (3.5),

$$\text{Selisih serapan (absorbansi)} = \text{serapan rata-rata} - \text{serapan kontrol} \quad (3.4)$$

$$= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})})$$

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000}{t \times 100} \quad (3.5)$$

Keterangan :

[*p*-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

3.4.5 Pembuatan kurva standard *p*-NP

3.4.5.1 Pembuatan larutan induk *p*-NP 20000 μM

Padatan *p*-NP sebanyak 0,0278 gram dilarutkan dengan larutan *buffer* fosfat dalam gelas beker 10 mL. Selanjutnya dipindahkan ke labu ukur 10 mL dan ditambahkan larutan *buffer* fosfat hingga tanda batas.

3.4.5.2 Pembuatan larutan kerja *p*-NP

Larutan kerja *p*-NP dibuat sesuai dengan perbandingan volume larutan induk *p*-NP 20 mM dan *buffer* fosfat pada Tabel 3.4. Pembuatan larutan kerja *p*-NP dilakukan melalui pengenceran larutan induk *p*-NP dengan larutan *buffer* fosfat pada labu ukur 10 mL. Perbandingan volume larutan induk *p*-NP dan *buffer* fosfat dilakukan seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Perbandingan volume larutan induk *p*-NP dan *buffer* fosfat

No	Larutan kerja <i>p</i> -NP (μM)	Larutan induk <i>p</i> -NP (mL)	Larutan <i>buffer</i> fosfat (mL)
1	200	0,1	9,9
2	400	0,2	9,8
3	600	0,3	9,7
4	800	0,4	9,6
5	1000	0,5	9,5

3.4.5.3 Penentuan kurva standart *p*-NP

Masing-masing larutan kerja *p*-NP diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Pengukuran tersebut menghasilkan kurva standar larutan *p*-NP dan persamaan regresi linear.

3.4.6 Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Uji inhibisi ini bertujuan untuk menguji pengaruh senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Pada pengujian ini menggunakan variabel pembanding untuk membandingkan aktivitas enzim yang terjadi saat tanpa adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dan dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Masing-masing sampel akan ditentukan keefektifannya terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas.

3.4.6.1 Pembuatan larutan *p*-NPP 20000 μM

Serbuk *p*-NPP ditimbang sebanyak 0,0075 gram dan dilarutkan dengan isopropil alkohol sebanyak 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*.

3.4.6.2 Pembuatan larutan campuran aseton : etanol (1 : 1)

Larutan aseton p.a. sebanyak 20 mL diambil dan ditambahkan larutan etanol p.a. sebanyak 20 mL. Kemudian, campuran aseton : etanol (1 : 1) sebanyak 40 mL dipindahkan ke dalam botol kaca dan disimpan dalam suhu -20 °C. Larutan

campuran aseton : etanol (1 : 1) digunakan untuk menghentikan reaksi enzimatik yang berlangsung (Kanwar *et al.*, 2005).

3.4.6.3 Uji aktivitas ekstrak lipase pankreas

Volume reaksi pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas adalah sebesar 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Ekstrak lipase pankreas sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang telah diisi larutan *buffer* fosfat sebanyak 875 μL dan ditambahkan 25 μL larutan *p*-NPP 20000 μM . Kemudian, Larutan campuran diinkubasi dalam penangas air pada pH dan suhu optimum selama 20 menit. Campuran reagen yang digunakan pada uji aktivitas ini dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Campuran reagen pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas

No	Ekstrak lipase pankreas (μL)	Larutan <i>p</i> -NPP		Larutan <i>buffer</i> fosfat (μL)
		μM	μL	
1	100	20000	25	875

Larutan campuran ditambahkan larutan aseton : etanol dingin sebanyak 350 μL bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Selanjutnya, larutan tersebut diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Perlakuan ini dilakukan secara duplo. Sebagai larutan kontrol digunakan ekstrak lipase pankreas yang telah diinaktifkan dengan perlakuan yang sama. Inaktifasi enzim lipase dilakukan dengan menambahkan larutan aseton : etanol dingin pada ekstrak lipase pankreas sebelum penambahan larutan *p*-NPP. Nilai absorbansi yang ditentukan merupakan pengurangan dari nilai absorbansi rata-rata dengan nilai absorbansi kontrol (Kanwar *et al.*, 2005).

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis perhitungan menggunakan persamaan (3.6) dan (3.7),

$$\begin{aligned} \text{Selisih serapan (absorbansi)} &= \text{serapan rata-rata} - \text{serapan kontrol} \quad (3.6) \\ &= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})}) \end{aligned}$$

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000}{t \times 100} \quad (3.7)$$

Keterangan :

[p-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

Pengertian 1 Unit (U) aktivitas enzim lipase (aktivitas lipolitik) merupakan banyaknya enzim yang menghasilkan $1 \mu\text{M}$ *p*-NP (*para*-nitrofenol) per menit.

Data yang diperoleh pada pengujian aktivitas enzim lipase ini adalah,

- a. Nilai absorbansi larutan uji yang menunjukkan terbentuknya *p*-nitrofenol (*para*-nitrofenol)
- b. Aktivitas enzim lipase yang dinyatakan sebagai Unit (U) per mL (U/mL).

3.4.6.4 Pembuatan larutan induk inhibitor enzim lipase $1000 \mu\text{g/mL}$

Inhibitor enzim lipase terdiri atas logam Cu(II) dari tembaga(II) asetat hidrat, ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Tembaga(II) asetat hidrat sebanyak 0,001 gram dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Kurkumin dan Cu(II)-kurkumin masing-masing ditimbang sebanyak 0,001 gram dan dilarutkan dengan dimetil sulfoksida. sebanyak 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*.

3.4.6.5 Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

Volume reaksi pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas adalah sebesar 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Tiga tabung *Eppendorf* disiapkan, kemudian masing-masing diisi dengan ekstrak lipase pankreas sebanyak 100 μL . Setelah itu, pada masing-masing tabung ditambahkan larutan kompleks Cu(II)-kurkumin dengan konsentrasi 50, 100, dan 200 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut didiamkan selama 5 menit agar enzim dapat bereaksi dengan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin yang bertindak sebagai inhibitor. Larutan *p*-NPP 20000 μM sebanyak 25 μL ditambahkan pada masing-masing tabung. Penambahan larutan *buffer* fosfat dilakukan sesuai dengan Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Campuran reagen pada uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

No	Ekstrak lipase pankreas (μL)	Larutan <i>p</i> -NPP (μL)	Larutan Cu(II)-kurkumin		Larutan <i>buffer</i> fosfat (μL)
			($\mu\text{g/mL}$)	(μL)	
1	100	25	50	50	825
2	100	25	100	100	775
3	100	25	200	200	675

Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi dalam penangas air pada pH dan suhu optimum selama 20 menit. Setelah inkubasi selesai, masing-masing tabung ditambahkan larutan campuran aseton : etanol dingin sebanyak 350 μL bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Lalu, masing-masing larutan diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Perlakuan ini dilakukan secara duplo. Sebagai larutan kontrol digunakan ekstrak lipase pankreas yang telah diinaktifkan dengan perlakuan yang sama. Inaktifasi enzim lipase

dilakukan dengan menambahkan larutan aseton : etanol dingin pada ekstrak lipase pankreas sebelum penambahan larutan *p*-NPP. Nilai absorbansi yang ditentukan merupakan pengurangan dari nilai absorbansi rata-rata dengan nilai absorbansi kontrol (Kanwar *et al.*, 2005).

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis perhitungan menggunakan persamaan (3.8), (3.9), dan (3.10),

$$\text{Selisih serapan (absorbansi)} = \text{serapan rata-rata} - \text{serapan kontrol} \quad (3.8)$$

$$= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})})$$

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000}{t \times 100} \quad (3.9)$$

Keterangan :

[*p*-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

Pengertian 1 Unit (U) aktivitas enzim lipase (aktivitas lipolitik) merupakan banyaknya enzim yang menghasilkan 1 μM *p*-NP (*para*-nitrofenol) per menit.

$$\text{Presentase inhibisi (\%)} = \frac{\text{aktivitas (E+S)} - \text{aktivitas (E+S+I)}}{\text{aktivitas (E+S)}} \times 100\% \quad (3.10)$$

Keterangan :

(E+S) : tanpa penambahan inhibitor

(E+S+I) : dengan penambahan inhibitor

Pada uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan uji inhibisi logam Cu(II) dan ligan kurkumin sebagai kontrol.

3.4.7 Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

3.4.7.1 Uji aktivitas substrat *p*-NPP tanpa adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Volume reaksi pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas adalah sebesar 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Lima tabung *Eppendorf* disiapkan kemudian masing-masing diisi dengan ekstrak lipase pankreas sebanyak 100 μL . Penambahan larutan *p*-NPP dan *buffer* fosfat dilakukan sesuai dengan Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Penambahan larutan *p*-NPP dan *buffer* fosfat pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas tanpa adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Ekstrak lipase pankreas (μL)	Larutan <i>p</i> -NPP		Larutan <i>buffer</i> fosfat (μL)
		(μM)	(μL)	
1	100	100	5	895
2	100	200	10	890
3	100	300	15	885
4	100	400	20	880
5	100	500	25	875
6	100	600	30	870

Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi dalam penangas air pada pH dan suhu optimum selama 20 menit. Setelah inkubasi selesai, masing-masing tabung ditambahkan larutan campuran aseton : etanol dingin sebanyak 350 μL bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Lalu, masing-masing larutan diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Perlakuan ini dilakukan secara duplo. Sebagai larutan kontrol digunakan ekstrak lipase pankreas yang telah dinaktifkan dengan perlakuan yang sama. Inaktifasi ekstrak lipase pankreas dilakukan dengan menambahkan larutan aseton : etanol dingin pada ekstrak lipase pankreas sebelum penambahan larutan *p*-NPP. Nilai absorbansi yang

ditentukan merupakan pengurangan dari nilai absorbansi rata-rata dengan nilai absorbansi kontrol (Kanwar *et al.*, 2005).

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis perhitungan menggunakan persamaan (3.11) dan (3.12),

$$\text{Selisih serapan (absorbansi)} = \text{serapan rata-rata} - \text{serapan kontrol} \quad (3.11)$$

$$= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})})$$

$$\text{Laju reaksi awal } (\mu\text{M/menit}) = \frac{[p\text{-NP}]}{t} \quad (3.12)$$

Keterangan :

[*p*-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

3.4.7.2 Uji aktivitas substrat *p*-NPP dengan adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Volume reaksi pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas adalah sebesar 1000 μL dalam tabung *Eppendorf*. Lima tabung *Eppendorf* disiapkan kemudian masing-masing diisi dengan ekstrak lipase pankreas sebanyak 100 μL . Setelah itu, pada masing-masing tabung ditambahkan 50 μL larutan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin 50 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut didiamkan selama 5 menit agar enzim dapat bereaksi dengan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebagai inhibitor. Penambahan larutan *p*-NPP dan *buffer* fosfat dilakukan sesuai dengan Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Penambahan larutan *p*-NPP dan *buffer* fosfat pada uji aktivitas ekstrak lipase pankreas dengan adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Ekstrak lipase pankreas (μL)	Larutan <i>p</i> -NPP		Larutan Cu(II)-kurkumin (μL)	Larutan <i>buffer</i> fosfat (μL)
		(μM)	(μL)		
1	100	100	5	50	845
2	100	200	10	50	840
3	100	300	15	50	835
4	100	400	20	50	830
5	100	500	25	50	825
6	100	600	30	50	820

Setelah itu, masing-masing tabung diinkubasi dalam penangas air pada pH dan suhu optimum selama 20 menit. Setelah inkubasi selesai, masing-masing tabung ditambahkan larutan campuran aseton : etanol dingin sebanyak 350 μL bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Lalu, masing-masing larutan diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Perlakuan ini dilakukan secara duplo. Sebagai larutan kontrol digunakan ekstrak lipase pankreas yang telah dinaktifkan dengan perlakuan yang sama. Inaktifasi ekstrak lipase pankreas dilakukan dengan menambahkan larutan aseton : etanol dingin pada ekstrak lipase pankreas sebelum penambahan larutan *p*-NPP. Nilai absorbansi yang ditentukan merupakan pengurangan dari nilai absorbansi rata-rata dengan nilai absorbansi kontrol (Kanwar *et al.*, 2005)..

Berdasarkan data yang diperoleh dilakukan analisis perhitungan menggunakan persamaan (3.13) dan (3.14),

$$\begin{aligned} \text{Selisih serapan (absorbansi)} &= \text{serapan rata-rata} - \text{serapan kontrol} \quad (3.13) \\ &= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})}) \end{aligned}$$

$$\text{Laju reaksi awal } (\mu\text{M}/\text{menit}) = \frac{[p\text{-NP}]}{t} \quad (3.14)$$

Keterangan :

[*p*-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

Tipe inhibitor dari senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat ditentukan dari kurva *Lineweaver-Burk* yang diperoleh dari hubungan antara laju reaksi awal lipase ($\mu\text{M}/\text{menit}$) dengan konsentrasi substrat (μM). Sumbu x pada kurva *Lineweaver-Burk* merupakan $1/[S]$ dan sumbu y merupakan $1/V_o$. Nilai tetapan *Michaelis-Menten* (K_M) dapat ditentukan dari *intercept* kurva dan nilai laju reaksi maksimum (V_{maks}) dapat ditentukan dari kemiringan / *slope* (Putri *et al.*, 2010).

BAB IV**HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dengan mereaksikan logam Cu(II) dari senyawa tembaga(II) asetat hidrat dan ligan kurkumin. Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin hasil sintesis telah dikarakterisasi menggunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, dan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB). Selanjutnya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin diuji pengaruhnya pada aktivitas enzim lipase.

4.1 Sintesis Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan dengan mereaksikan logam Cu(II) dari tembaga(II) asetat hidrat ($\text{CuC}_2\text{H}_3\text{O}_5$) dan ligan kurkumin pada perbandingan mol 1 : 2. Pada penelitian ini dipilih pelarut etanol karena etanol dapat melarutkan logam dan ligan dengan sangat baik. Senyawa Cu(II)-kurkumin yang dihasilkan berwarna kuning kecoklatan ditunjukkan pada Gambar 4.1,



Gambar 4.1 (a) logam Cu(II) dari tembaga(II) asetat hidrat, (b) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin hidrat, dan (c) ligan kurkumin hidrat

4.2 Karakterisasi Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada penelitian ini senyawa kompleks hasil sintesis dikarakterisasi untuk mengetahui karakteristik senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Karakterisasi senyawa kompleks ini meliputi uji titik leleh dengan *Fischer-John Melting Point Apparatus*, penentuan panjang gelombang (λ) dengan spektrofotometer UV-Vis, penentuan gugus fungsi dengan spektrofotometer FTIR, dan penentuan momen magnet efektif dengan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB).

4.2.1 Penentuan titik leleh

Pada penentuan titik leleh digunakan *Fischer-John Melting Point Apparatus*. Penentuan titik leleh bertujuan menentukan adanya senyawa kompleks yang telah terbentuk, dimana senyawa kompleks memiliki titik leleh yang berbeda dengan logam dan ligan. Hasil pengukuran titik leleh senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin hidrat dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pengamatan uji titik leleh hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Senyawa	Titik leleh (°C)
1	Tembaga(II) asetat hidrat	115 (Anonim, 2016)
2	Kurkumin	194
3	Cu(II)-kurkumin	276

Pada Tabel 4.1 dapat diperoleh bahwa pada hasil pengujian senyawa kompleks dari hasil sintesis menunjukkan telah terbentuk senyawa baru. Hal ini ditandai dengan besarnya titik leleh senyawa kompleks yang berbeda dengan logam dan ligan penyusunnya (Imaduddin, 2015). Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dari hasil sintesis memiliki titik leleh sebesar 276 °C, sedangkan ligan kurkumin

memiliki titik leleh sebesar 194 °C dan logam tembaga(II) asetat hidrat memiliki titik leleh sebesar 115 °C.

Uji titik leleh juga dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian senyawa kompleks yang terbentuk. Rentang kenaikan suhu merupakan rentang suhu ketika senyawa mula meleleh hingga meleleh seluruhnya. Senyawa dikatakan murni apabila rentang kenaikan suhu sebesar 1-2 °C (Hart *et al.*, 2012). Pada hasil pengukuran dapat diperoleh senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin mulai meleleh pada suhu 276 °C dan meleleh seluruhnya pada suhu 278 °C. Hal ini menunjukkan bahwa hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dikatakan murni karena memiliki rentang kenaikan suhu sebesar 2 °C dan memiliki titik leleh yang berbeda dengan ligan dan logam penyusunnya.

4.2.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada penentuan panjang gelombang maksimum digunakan spektrofotometer UV-Vis. Pelarut yang digunakan adalah dimetil sulfoksida. Hal ini disebabkan karena senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki kelarutan yang tinggi dalam lemak, surfaktan Tx-100, dan dimetil sulfoksida (Barik, *et al.*, 2007). Larutan Cu(II)-kurkumin diukur panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) pada daerah 200-900 nm (Refat, 2013). Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dan kurkumin dilarutkan dalam pelarut dimetil sulfoksida dengan konsentrasi yang sama (10^{-5} M). Logam Cu(II) dari tembaga(II) asetat hidrat tidak dapat dibandingkan dengan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin karena perbedaan kelarutan pada keduanya. Logam Cu(II) cenderung larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin larut dalam pelarut semipolar.

Hasil pengamatan pada analisis serapan dan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Tabel 4.2.

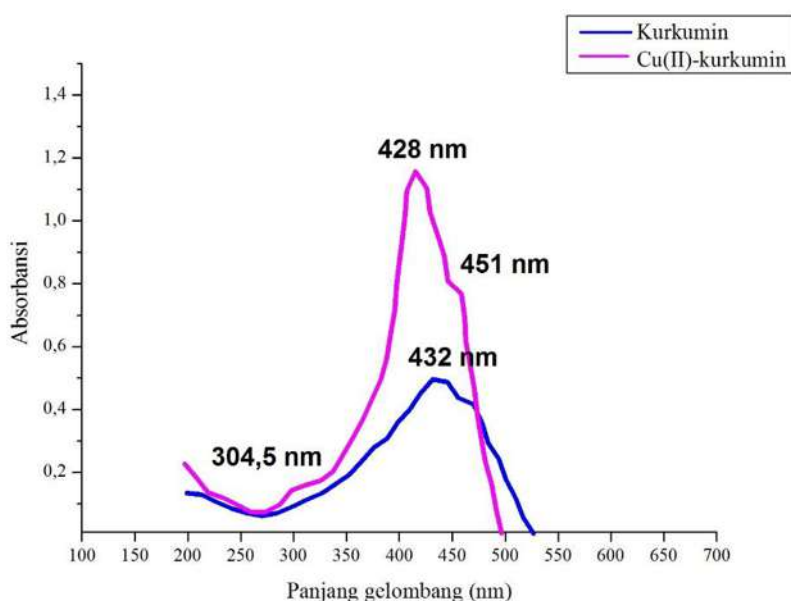
Tabel 4.2 Hasil pengamatan analisis serapan dan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Senyawa	λ_{maks} (nm)	Absorbansi
1	Kurkumin	432	0,414
2	Cu(II)-kurkumin	304,5	0,219
		428	1,084
		451	0,871

Pada Tabel 4.2 dapat diperoleh bahwa panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) kurkumin memiliki perbedaan dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Pada daerah panjang gelombang 200-300 nm merupakan daerah transisi elektronik $\pi - \pi^*$, sedangkan pada daerah panjang gelombang 310-470 nm merupakan daerah transisi elektronik $n - \pi^*$. Kurkumin memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 432 nm menurut literatur 430 nm yang merupakan transisi elektronik $n - \pi^*$. Cu(II)-kurkumin memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 451 nm dan 428 nm menurut literatur 448 nm dan 358 nm yang merupakan transisi elektronik $n - \pi^*$ dan 304,5 nm menurut literatur 274 nm yang merupakan transisi elektronik $\pi - \pi^*$ (spektum UV-Vis ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Lampiran 1) (Refat, 2013).

Pada larutan Cu(II)-kurkumin dengan pelarut dimetil sulfoksida berwarna kuning, dimana warna kuning memiliki warna komplemen ungu dengan serapan pada panjang gelombang 400-450 nm. Warna komplemen merupakan warna yang diserap oleh sampel dan merupakan kebalikan dengan warna yang terlihat pada sampel (Miessler *et al.*, 2014). Panjang gelombang pada warna komplemen larutan

Cu(II)-kurkumin sesuai dengan hasil pengamatan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin yang memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 428 nm dengan serapan sebesar 1,084 (dapat dilihat pada Lampiran 1.1). Hal ini sesuai dengan teori warna yang menyatakan bahwa suatu senyawa yang berwarna akan menyerap energi pada panjang gelombang warna komplementer senyawanya (Swastika *et al.*, 2012). Pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.2.



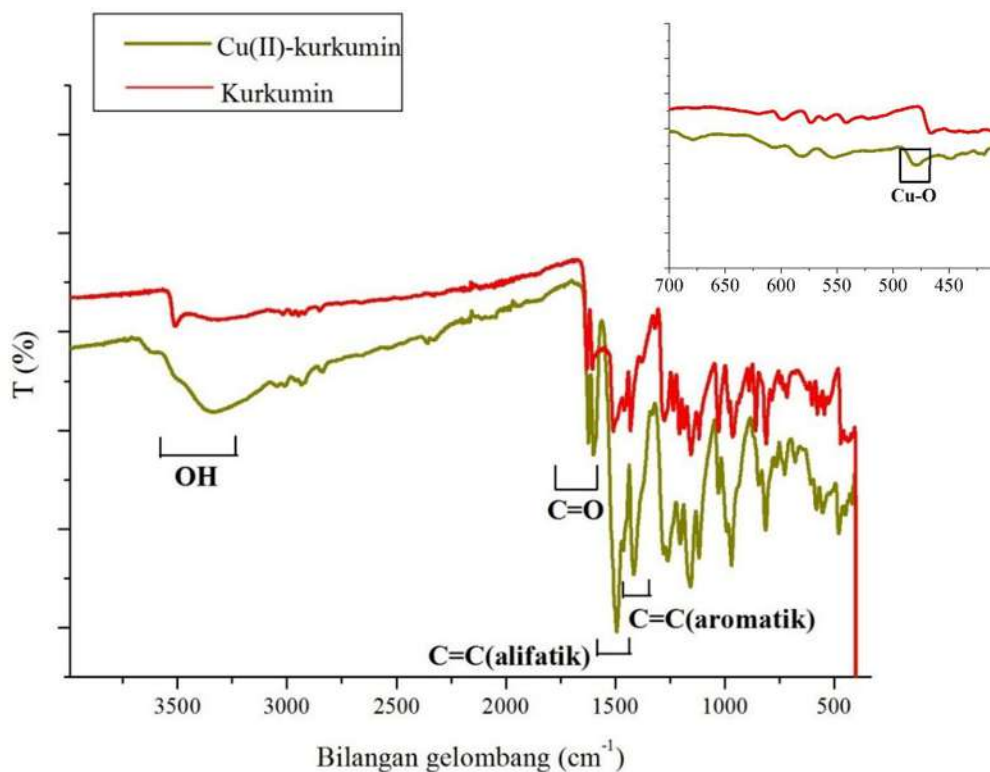
Gambar 4.2 Pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebesar 428 nm bergeser dari ligan kurkumin sebesar 432 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) ligan kurkumin ke panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin yang lebih rendah merupakan pergeseran hipsokromik / pergeseran biru. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kelarutan ligan kurkumin pada pelarut

etanol dan kelarutan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin pada pelarut dimetil sulfoksida. Dimetil sulfoksida dengan nilai konstanta dielektrik sebesar 47 memiliki kepolaran lebih tinggi dibandingkan etanol dengan nilai konstanta dielektrik sebesar 30 (Anonim, 2016). Adanya kelarutan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin pada pelarut yang lebih polar dibandingkan ligan kurkumin menyebabkan adanya pergeseran hipsokromik / pergeseran biru (Murnah, 2012). Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki serapan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 1,084 lebih tinggi dibandingkan ligan kurkumin yang memiliki serapan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 0,414. Pergeseran serapan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) ligan kurkumin ke serapan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang lebih tinggi merupakan pergeseran hiperkromik. Hal ini disebabkan karena pada struktur senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki jumlah ikatan rangkap terkonjugasi lebih besar dibandingkan ligan kurkumin (seperti pada Gambar 4.4) (Kharomah, 2015).

4.2.3 Analisis gugus fungsi dan ikatan logam dengan ligan

Karakterisasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin menggunakan spektrofotometer FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi dan ikatan yang terbentuk antara logam dengan ligan. Karakterisasi spektrofotometer FTIR dilakukan pada ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Penentuan ikatan yang terjadi pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin ditunjukkan pada puncak yang berbeda pada ligan kurkumin. Hasil FTIR ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil FTIR ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Hasil FTIR ligan kurkumin, senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dan data teoritis dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil FTIR kurkumin, Cu(II)-kurkumin dan data teoritis

No	Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)		
		Teoritis	Kurkumin	Cu(II)-kurkumin
1	O-H	3550-3300 (Stuart, 2004)	3508	3329
2	C=O	1830-1530 (Stuart, 2004)	1601 dan 1626	1599 dan 1623
3	C=C (alifatik)	1600-1430 (Stuart, 2004)	1505	1494
4	C=C (aromatis)	1630-1400 (Stuart, 2004)	1427	1416
5	Cu-O	600 – 400 (daerah untuk atom yang memiliki massa relatif tinggi) (Stuart, 2004)	-	479

Pada hasil FTIR kurkumin dan Cu(II)-kurkumin sesuai dengan data teoritis. Hal ini ditunjukkan dengan adanya gugus fungsi OH, C=O, C=C (alifatik), C=C (aromatis) dan logam-O pada kurkumin dan Cu(II)-kurkumin yang sesuai dengan data teoritis. Hasil FTIR senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdapat vibrasi ikatan Cu-O yang terdapat pada daerah sidik jari dengan bilangan gelombang sebesar 479 cm^{-1} . Vibrasi ikatan Cu-O menurut literatur muncul pada bilangan gelombang 479 cm^{-1} yang sesuai dengan hasil pengamatan. Atom oksigen (O) pada interaksi Cu-O merupakan atom oksigen (O) dari gugus fungsi hidroksi. Hal ini ditunjukkan dengan pergeseran bilangan gelombang pada gugus OH dari 3508 cm^{-1} pada kurkumin menjadi 3329 cm^{-1} pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Adanya pergeseran gugus OH menunjukkan telah terbentuk ikatan antara atom Cu dengan gugus OH. Pada literatur, gugus OH pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdapat pada bilangan gelombang 3392 cm^{-1} (Refat, 2013). Adanya interaksi logam dengan ligan juga ditunjukkan dengan pergeseran bilangan gelombang pada gugus fungsi C=O, C=C (alifatik) dan C=C (aromatis) ligan kurkumin. Pada gugus fungsi C=O menunjukkan pergeseran dari bilangan gelombang 1601 cm^{-1} dan 1626 cm^{-1} pada kurkumin menjadi 1599 cm^{-1} dan 1623 cm^{-1} pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Pada literatur, vibrasi ikatan C=O pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdapat pada bilangan gelombang 1590 cm^{-1} dan 1619 cm^{-1} (Zhao et al., 2010). Pada ikatan C=C (alifatik) terdapat pergeseran bilangan gelombang 1505 cm^{-1} pada kurkumin menjadi 1494 cm^{-1} pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Pada literatur, vibrasi ikatan C=C (alifatik) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdapat pada bilangan gelombang 1509 cm^{-1} .

Pada ikatan C=C (aromatis) terdapat pergeseran bilangan gelombang 1427 cm^{-1} pada kurkumin menjadi 1416 cm^{-1} pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Pada literatur ikatan C=C (aromatis) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdapat pada bilangan gelombang 1408 cm^{-1} (spektum FTIR ligan kurkumin dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Lampiran 2) (Refat, 2013).

Pada pembahasan gugus fungsi dan ikatan logam-ligan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat disimpulkan pada hasil sintesis telah terbentuk senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin ditandai dengan adanya ikatan Cu-O dari gugus hidroksi dan pergeseran gugus fungsi C=O, C=C (alifatik) dan C=C (aromatis) ligan kurkumin.

4.2.4 Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff})

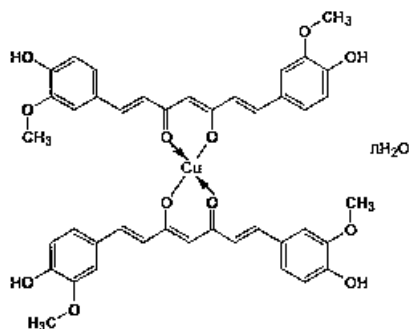
Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin menggunakan *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB). Penentuan momen magnet efektif (μ_{eff}) dilakukan pada logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Penentuan momen magnet efektif yang terjadi pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin ditunjukkan pada nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) yang berbeda dari logam Cu(II) dan ligan kurkumin. Tabel pengamatan pada analisis momen magnet efektif (μ_{eff}) hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil pengamatan analisis momen magnet efektif (μ_{eff}) hasil sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Senyawa	μ_{eff} (BM)	Sifat kemagnetan
1	Tembaga(II) asetat hidrat	1,518	Paramagnetik
2	Kurkumin	-	Diamagnetik
3	Cu(II)-kurkumin	2,613	Paramagnetik

Pada Tabel 4.4 dapat diperoleh bahwa momen magnet efektif (μ_{eff}) senyawa kompleks Cu(II)-kurumin berbeda dengan momen magnet efektif (μ_{eff}) logam Cu(II) dan ligan kurkumin. Logam Cu(II) memiliki 1 elektron tidak berpasangan sehingga momen magnet efektif (μ_{eff}) yang dihasilkan sebesar 1,518 BM. Logam Cu(II) dengan nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) sebesar 1,518 BM bersifat paramagnetik. Ligan kurkumin tidak memiliki momen magnet efektif (μ_{eff}). Hal ini dikarenakan kurkumin tidak memiliki elektron tidak berpasangan pada struktur molekulnya, sehingga ligan kurkumin bersifat diamagnetik. Pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki momen magnet efektif (μ_{eff}) sebesar 2,613 BM, sehingga senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin bersifat paramagnetik. Adanya ligan pada senyawa kompleks dapat meningkatkan atau menurunkan momen magnet efektif (μ_{eff}) dari logam bebas, sehingga adanya ligan kurkumin dapat meningkatkan momen magnet efektif (μ_{eff}) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin (Miessler *et al.*, 2014).

Pada penelitian Refat (2013) menyatakan bahwa struktur senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terdiri atas 1 logam pusat dan 2 ligan kurkumin. Struktur molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.4.

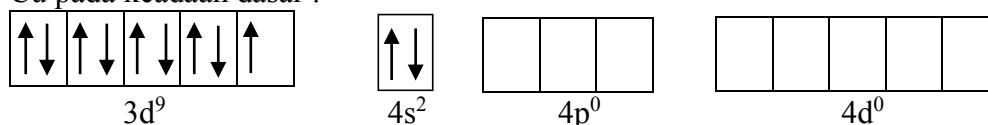


Gambar 4.4 Struktur molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin, $n = 0$ atau 2 (Refat, 2013)

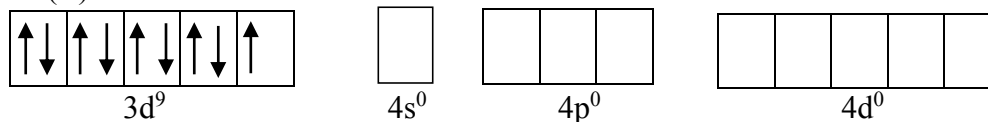
Pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dengan hibridisasi dsp^2 memiliki struktur geometri segi empat planar seperti pada Gambar 4.4 (Refat, 2013). Orbital molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki 1 buah elektron tidak berpasangan seperti pada Gambar 4.5. Nilai momen magnet (μ) secara teoritis dapat ditentukan dari banyaknya elektron tidak berpasangan, dimana pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki momen magnet (μ) sebesar 1,73 BM (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 3.3). Pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dengan momen magnet (μ) sebesar 1,73 BM bersifat paramagnetik. Orbital molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.5.



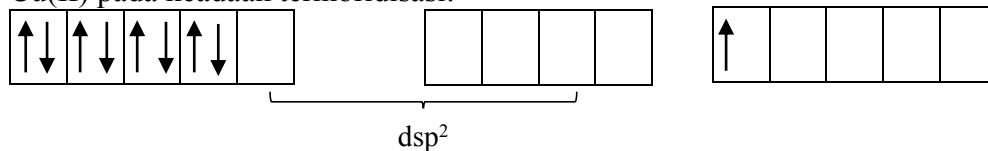
Cu pada keadaan dasar :



Cu(II) :

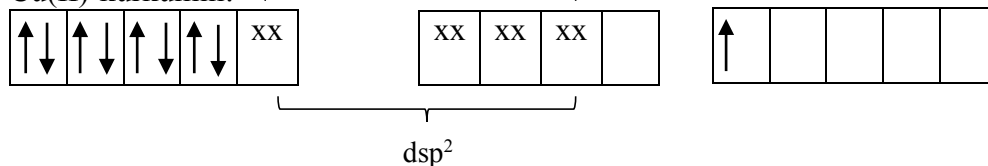


Cu(II) pada keadaan terhibridisasi:



Ligan kurkumin

Cu(II)-kurkumin:



Gambar 4.5 Orbital molekul senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

4.3 Uji Aktivitas Senyawa Kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase. Pengaruh senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin pada penghambatan atau peningkatan aktivitas enzim lipase dapat dilihat dari pembentukan produk *p*-NP. Enzim lipase yang digunakan pada penelitian ini merupakan enzim lipase yang berasal dari ekstrak lipase pankreas. Pankreas yang digunakan berasal dari pankreas sapi, karena lipase yang diperoleh dari pankreas sapi memiliki kesamaan urutan asam amino sebesar 88 % dengan lipase pankreas manusia (Tanaka *et al.*, 1999) Enzim lipase pankreas kasar direaksikan dengan substrat *p*-NPP untuk menghasilkan produk *p*-NP. Substrat *p*-NPP digunakan karena produk *p*-NP yang dihasilkan merupakan senyawa berwarna kuning dan dapat diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Aktivitas enzim lipase dihitung berdasarkan produk *p*-NP yang terbentuk.

4.3.1 Ekstraksi enzim lipase pankreas

Pada ekstraksi enzim lipase dari pankreas sapi digunakan 2 buah pankreas sapi (500 gram) yang telah dibersihkan dari jaringan lemak. Pankreas sapi ditambahkan sukrosa dingin (4 °C) 0,01 M dan disimpan pada suhu -20 °C. Sukrosa pekat (0,01 M) dapat menarik cairan dalam sel (osmosis), sehingga pereaksi pada penelitian ini digunakan sukrosa 0,01 M (Pertiwi *et al.*, 2014). Pankreas kemudian diblender selama 5 menit. Ekstrak disaring melalui beberapa lapisan kain tipis untuk menghilangkan sisa jaringan lemak. Larutan campuran

disentrifuge untuk memisahkan sisa jaringan lemak pada bagian atas, ekstrak lipase pada bagian tengah, dan debris sel pada bagian bawah (Shahani *et al.*, 1975).

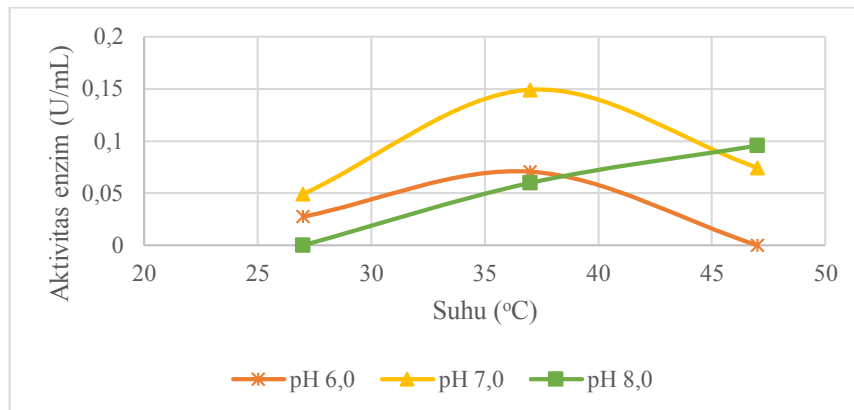
4.3.1.1 Penentuan suhu dan pH optimum ekstrak lipase pankreas

Pada penelitian ini dilakukan penentuan suhu dan pH optimum ekstrak lipase pankreas untuk menentukan kondisi optimum pada uji aktivitas enzim lipase. Pada penentuan suhu dan pH optimum dilakukan variasi suhu sebesar 27 °C, 37 °C, dan 47 °C, dan pH *buffer* fosfat sebesar 6, 7, dan 8. Suhu dan pH optimum ditentukan dari aktivitas enzim lipase paling tinggi. Hasil pengamatan aktivitas ekstrak lipase pankreas dengan variasi suhu dan pH *buffer* fosfat dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil pengamatan aktivitas ekstrak lipase pankreas dengan variasi suhu dan pH *buffer* fosfat

Suhu	pH <i>buffer</i> fosfat		
	6,0	7,0	8,0
27 °C	0,027	0,049	0
37 °C	0,071	0,149	0,060
47 °C	0	0,074	0,096

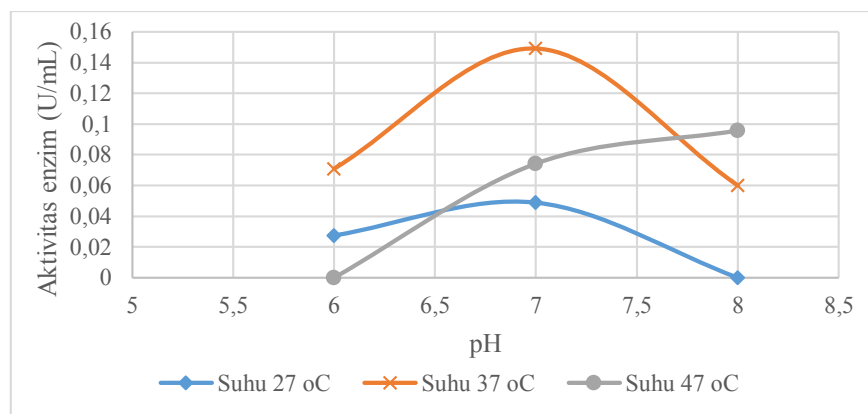
Pada hasil pengamatan dapat diperoleh suhu dan pH optimum ekstrak lipase pankreas adalah pada suhu 37 °C dan *buffer* fosfat pH 7,0 dengan aktivitas sebesar 0,1491 U/mL (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5). Pada penentuan suhu dan pH optimum dapat diperoleh pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim lipase. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

Pada Gambar 4.6 dapat diperoleh bahwa pada suhu 27 °C hingga 37 °C aktivitas enzim lipase mengalami peningkatan, sedangkan pada suhu 37 °C hingga 47 °C aktivitas enzim lipase mengalami penurunan. Kenaikan suhu akan meningkatkan aktivitas suatu enzim sekitar 4 – 8 % per °C, meskipun pada suhu tinggi enzim akan mengalami denaturasi protein yang mengakibatkan penurunan aktivitas enzim tersebut (Scopes, 2002). Pada suhu 27 °C enzim lipase memiliki aktivitas yang rendah pada pH 6, 7, dan 8. Hal ini disebabkan karena pada suhu rendah kecepatan reaksi enzimatik cenderung lebih lambat sehingga dihasilkan produk yang lebih sedikit. Pengaruh suhu terhadap kecepatan reaksi enzimatik hampir sama seperti kecepatan reaksi kimia secara umum (Scopes, 2002). Pada suhu 47 °C enzim lipase memiliki aktivitas yang rendah pada pH 6, 7, dan 8. Aktivitas enzim lipase pada suhu 47 °C lebih rendah dibandingkan pada suhu 37 °C. Hal ini disebabkan karena pada suhu tinggi enzim mengalami denaturasi, sehingga menurunkan aktivitas enzim. Peningkatan suhu disekitar enzim akan menyebabkan pemutusan ikatan hidrogen, ikatan ion, dan interaksi hidrofobik. Hal ini dapat menyebabkan perubahan struktur tersier enzim. Perubahan struktur tersier enzim mengakibatkan

perubahan sisi aktif enzim, sehingga mengakibatkan penurunan aktivitas enzim (Noviyanti *et al.*, 2012). Pada suhu 37 °C enzim lipase memiliki aktivitas tertinggi pada pH 6, 7, dan 8, sehingga pada suhu 37 °C merupakan suhu optimum untuk pengukuran aktivitas enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas (Shahani *et al.*, 1975). Pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

Pada Gambar 4.7 dapat diperoleh bahwa aktivitas enzim lipase tertinggi berada pada pH 7,0, sedangkan pada pH 6,0 dan 8,0 memiliki aktivitas lebih rendah karena pada pH ini enzim lipase yang merupakan protein terdenaturasi akibat pH yang lebih asam dan lebih basa. Enzim yang merupakan protein tersusun atas asam amino yang dapat mengikat dan melepaskan ion hidrogen pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsi lainnya, sehingga penambahan ion hidrogen pada kondisi asam dan ion hidroksi pada kondisi basa akan mempengaruhi pelepasan ion hidrogen pada gugus-gugus fungsi tersebut (Yusriah *et al.*, 2013). Pada pH 7,0 merupakan pH optimum untuk pengukuran aktivitas ekstrak lipase pankreas, oleh karena itu pada pengukuran aktivitas enzim lipase digunakan *buffer* fosfat pH 7,0.

4.3.2 Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

4.3.2.1 Uji aktivitas ekstrak lipase pankreas

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas dengan substrat *p*-NPP tanpa dilakukan penambahan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebagai inhibitor. Pengujian ini dilakukan sebagai kontrol pada uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Uji aktivitas ekstrak lipase pankreas terhadap substrat *p*-NPP diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Absorbansi yang dihasilkan pada pengukuran ini adalah sebesar 0,349. Konsentrasi *p*-NP dari hasil absorbansi dapat dihitung berdasarkan persamaan regresi linier sebesar 0,554 μ M. Aktivitas enzim lipase dapat diperoleh sebesar 0,277 Unit/mL. Pengertian 0,277 Unit (U) aktivitas enzim lipase (aktivitas lipolitik) merupakan banyaknya enzim yang menghasilkan 0,277 μ M *p*-NP per menit (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6.1).

4.3.2.2 Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

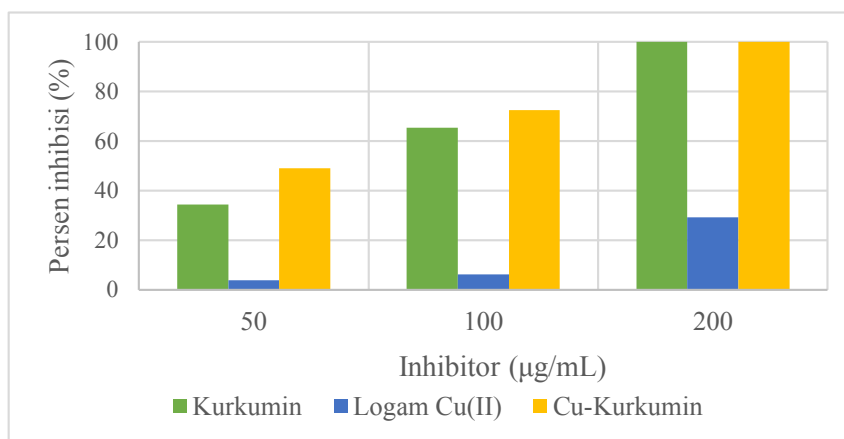
Pada penelitian ini dilakukan uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Pada pengujian ini dilakukan penambahan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin pada konsentrasi 50, 100, dan 200 (μ g/mL) dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Pada pengujian ini juga dilakukan uji inhibisi logam Cu(II) dan ligan kurkumin dengan perlakuan yang sama sebagai pembanding.

Variasi konsentrasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas terdapat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

Inhibitor	$\mu\text{g/mL}$	Absorbansi		[p-NP]	Aktivitas (U/mL)	Inhibisi (%)
		Kontrol	Sampel			
Cu(II)	0	0,485	0,835 0,833	0,5536	0,2768	0
	50	0,523	0,859 0,857	0,5325	0,2663	3,8
	100	0,485	0,809 0,814	0,5197	0,2599	6,12
	200	0,537	0,775 0,782	0,3917	0,1958	29,2
Kурkumin	0	0,485	0,835 0,833	0,5536	0,2768	0
	50	0,624	0,846 0,848	0,3638	0,1819	34,28
	100	1,12	1,219 1,232	0,1921	0,096	65,32
	200	1,161	0,912 0,929	0	0	100
Cu(II)- kurkumin	0	0,485	0,835 0,833	0,5536	0,2768	0
	50	1,1	1,254 1,283	0,2817	0,1408	49,11
	100	1,039	1,117 1,126	0,1522	0,0761	72,51
	200	0,931	0,801 0,803	0	0	100

Grafik persentase inhibisi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas dapat dilihat pada Gambar 4.8 (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6.2).



Gambar 4.8 Grafik persentase inhibisi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas

Pada Tabel 4.8 dapat diperoleh persentase inhibisis logam Cu(II) secara berturut-turut sebesar kontrol (inhibisi 0 %), Cu(II) 50 µg/mL (inhibisi 3,80 %), Cu(II) 100 µg/mL (inhibisi 6,12 %), dan Cu(II) 200 µg/mL (inhibisi 29,20 %). Peningkatan konsentrasi logam Cu(II) sebanding dengan peningkatan persentase inhibisi. Hal ini sesuai dengan sifat logam Cu(II) sebagai inhibitor enzim lipase. Penelitian Hegedus dkk (1988) menyatakan bahwa logam Cu(II) 160 µg/mL (1 mM) memiliki persentase inhibisi enzim lipase dari jamur *Beauveria bassiana* sebesar 31 %. Logam Cu(II) 318 µg/mL (5 mM) merupakan inhibitor kuat pada enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan persentase inhibisi sebesar 94 % (Karadzic *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa Cu(II) dengan variasi konsentrasi 0, 50, 100, dan 200 µg/mL dapat menghambat aktivitas enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas. Logam Cu(II) termasuk logam berat, sehingga dalam tubuh harus dibatasi konsentrasi maksimumnya. Dirjen

Pengawasan Obat dan Makanan (POM) RI telah menetapkan batas maksimum cemaran logam berat tembaga pada sayuran segar yaitu 50 ppm. Namun demikian, tembaga merupakan konstituen yang harus ada dalam makanan manusia dan dibutuhkan oleh tubuh (Acceptance Daily Intake/ADI = 0,05 mg/kg berat badan). Pada kadar ini tidak terjadi akumulasi pada tubuh manusia normal. Akan tetapi asupan dalam jumlah yang besar pada tubuh manusia dapat menyebabkan gejala-gejala yang akut. Toksisitas logam tembaga pada manusia, khususnya anak-anak biasanya terjadi karena tembaga sulfat. Beberapa gejala keracunan tembaga adalah sakit perut, mual, muntah, diare dan beberapa kasus yang parah dapat menyebabkan gagal ginjal dan kematian. Penyakit wilson merupakan penyakit keturunan dimana sejumlah tembaga terkumpul dalam jaringan dan menyebabkan kerusakan jaringan yang luas (Widianingrum, 2007).

Pada persentase inhibisi ligan kurkumin secara berturut-turut sebesar kontrol (inhibisi 0 %), kurkumin 50 µg/mL (inhibisi 34,28 %), kurkumin 100 µg/mL (inhibisi 65,32 %), dan kurkumin 200 µg/mL (inhibisi 100 %) (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6.2). Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa kurkumin dengan variasi konsentrasi 0, 50, 100, dan 200 µg/mL dapat menghambat aktivitas enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas. Hal ini sesuai dengan sifat kurkumin sebagai salah satu senyawa polifenol yang berperan sebagai inhibitor enzim lipase (Lunagariya *et al.*, 2014). Pada kurkumin 200 µg/mL memberikan persentase inhibisi sebesar 100 %. Hal ini disebabkan karena kurkumin pada konsentrasi 200 µg/mL telah berikatan dengan semua sisi aktif enzim lipase, sehingga aktivitas enzim lipase diperoleh sebesar 0 U/mL dan

persentase inhibisi sebesar 100 %. Kurkumin pada konsentrasi tinggi dapat menimbulkan toksisitas pada tubuh. Kurkumin memiliki LD50 sebesar 1.500 mg/Kg. LD50 merupakan konsentrasasi suatu senyawa untuk memberikan efek kematian pada 50 % sampel uji. Pada kurkumin peningkatan 0,1 % dari LD50 dapat menimbulkan efek karsinogenik (Anonim, 2012). Kurkumin pada konsentrasi tinggi dapat berpotensi sebagai khelator ion besi dalam tubuh dan berperan dalam metabolisme ion besi. Hal ini dapat mengakibatkan timbulnya anemia. Kurkumin juga telah terbukti dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450, *glutathione-S-transferase*, dan *UDP-glucuronosyltransferase* yang berperan pada metabolisme obat pada tubuh (Burgos-Morón, 2010).

Pada persentase inhibisis Cu(II)-kurkumin secara berturut-turut sebesar kontrol (inhibisi 0 %), Cu(II)-kurkumin 50 µg/mL (inhibisi 49,11 %), Cu(II)-kurkumin 100 µg/mL (inhibisi 72,51 %), dan Cu(II)-kurkumin 200 µg/mL (inhibisi 100 %). Berdasarkan hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa Cu(II)-kurkumin dengan variasi konsentrasi 0, 50, 100, dan 200 µg/mL dapat menginhibisi aktivitas enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas. Pada Cu(II)-kurkumin 200 µg/mL memberikan persentase inhibisis sebesar 100 %. Hal ini disebabkan karena Cu(II)-kurkumin pada konsentrasi 200 µg/mL telah berikatan dengan semua sisi aktif enzim, sehingga aktivitas enzim lipase diperoleh sebesar 0 U/mL dan persentase inhibisi sebesar 100 %.

Pada Gambar 4.7 dapat diperoleh perbandingan persentase inhibisi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap ekstrak lipase pankreas. Aktivitas enzim lipase dengan adanya ligan kurkumin memiliki

aktivitas lebih rendah dibandingkan dengan adanya logam Cu(II). Persentase inhibisi enzim lipase dengan adanya ligan kurkumin lebih tinggi dibandingkan dengan adanya logam Cu(II). Hal ini disebabkan karena ion logam dapat berikatan secara koordinasi dengan beberapa asam amino pada sisi aktif enzim dan dapat membentuk ikatan koordinasi dengan substrat. Penambahan logam Cu dan konsentrasi tinggi akan berikatan dengan serin, glisin, dan gugus-gugus fungsi asam amino seperti gugus amin dan sulfhidril yang merupakan gugus fungsional protein (Widoretno *et al.*, 2000). Adanya ikatan tersebut dapat mempermudah (aktivator) atau menghambat (inhibitor) pemecahan substrat oleh enzim. Pada konsentrasi tertentu ion logam dapat menjadi aktivator dan pada konsentrasi tertentu dapat menjadi inhibitor (Pratwi *et al.*, 2013). Logam Cu(II) memiliki kemampuan inhibisi enzim lipase dengan cara membentuk ikatan koordinasi dengan asam amino pada sisi aktif enzim dan substrat *p*-NPP. Logam Cu(II) pada konsentrasi rendah yaitu 50, 100, dan 200 µg/mL tidak dapat mengikat semua sisi aktif enzim, sehingga masih terdapat sisi aktif enzim yang tidak berikatan dengan logam Cu(II). Kurangnya konsentrasi logam Cu(II) untuk berikatan dengan sisi aktif enzim menyebabkan adanya substrat *p*-NPP yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Hal ini menyebabkan aktivitas enzim lipase yang masih tinggi dan persentase inhibisi yang lebih rendah. Disamping itu, ligan kurkumin sebagai senyawa polifenol dapat berikatan dengan sisi aktif enzim lipase pada sisi polivalen yang terdapat pada struktur molekulnya (Lunagariya *et al.*, 2014). Adanya ikatan yang kuat antara ligan kurkumin dan sisi aktif enzim menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim lipase dalam menghidrolisis substrat *p*-NPP. Hal ini menyebabkan

persentase inhibisi ligan kurkumin lebih tinggi dibandingkan dengan logam Cu(II). Aktivitas enzim lipase dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan dengan adanya ligan kurkumin dan logam Cu(II). Persentase inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin lebih besar dibandingkan persentase inhibisi ligan kurkumin dan logam Cu(II). Hal ini disebabkan karena perbandingan mol ligan kurkumin lebih besar dibandingkan logam Cu(II), sehingga senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki sifat dasar sesuai dengan ligan kurkumin pembentuknya. Kesamaan sifat dasar ligan kurkumin dengan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin menyebabkan kemampuan inhibisi enzim lipase dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin hampir sama dengan kemampuan inhibisi enzim lipase dengan adanya ligan kurkumin. Disamping itu, adanya logam Cu(II) sebagai inhibitor enzim lipase dapat meningkatkan kemampuan inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin.

4.3.3 Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dilakukan dengan pengujian aktivitas ekstrak lipase pankreas terhadap variasi konsentrasi substrat *p*-NPP tanpa dan dengan penambahan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Uji aktivitas substrat *p*-NPP dilakukan penambahan substrat *p*-NPP pada konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 μ M dengan penambahan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin pada konsentrasi 50 μ g/mL. Larutan campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 410 nm (Kanwar *et al.*, 2005). Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi

substrat *p*-NPP terhadap laju reaksi awal ekstrak lipase pankreas tanpa dan dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Tabel 4.7.

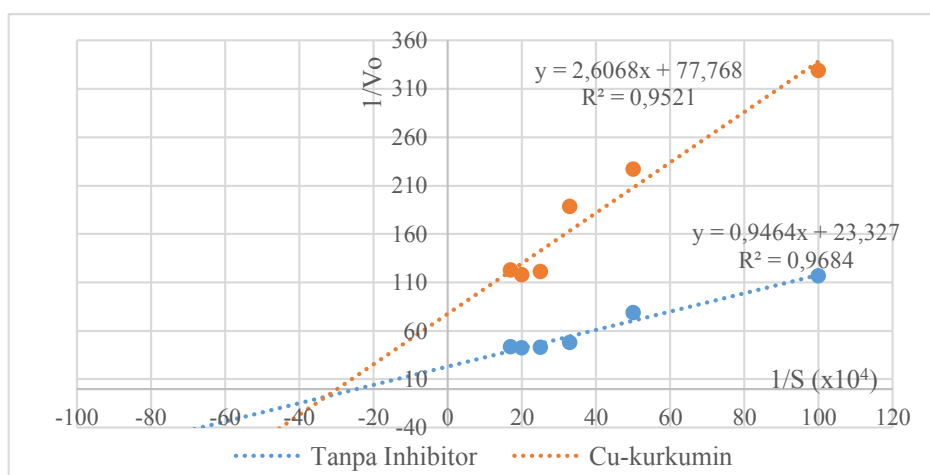
Tabel 4.7 Hasil pengamatan pengaruh konsentrasi substrat *p*-NPP terhadap laju reaksi awal ekstrak lipase pankreas tanpa dan dengan adanya senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Konsentrasi Cu(II)-kurkumin ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi substrat <i>p</i> -NPP (μM)	Rata-rata absorpsi	Konsentrasi <i>p</i> -NP (μM)	Laju reaksi awal ($\mu\text{M}/\text{menit}$)
0	100	0,096	0,172	0,009
	200	0,150	0,254	0,013
	300	0,259	0,418	0,021
	400	0,290	0,466	0,023
	500	0,294	0,472	0,024
	600	0,286	0,411	0,023
50	100	0,022	0,061	0,003
	200	0,040	0,088	0,004
	300	0,052	0,106	0,005
	400	0,091	0,165	0,008
	500	0,090	0,170	0,008
	600	0,088	0,163	0,008

Pada Tabel 4.7 dapat diperoleh laju reaksi ekstrak lipase pankreas pada variasi substrat *p*-NPP (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 7). Laju reaksi ekstrak lipase pankreas pada konsentrasi substrat *p*-NPP 100, 200, 300, dan 400 μM mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat, sedangkan aktivitas enzim lipase pada konsentrasi substrat *p*-NPP 500 dan 600 μM tidak mengalami penurunan seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat. Hal ini disebabkan karena adanya pengaruh enzim terhadap substrat. Kenaikan konsentrasi substrat akan menaikkan laju reaksi enzim dan pada konsentrasi substrat tertentu tidak mengalami kenaikan / konstant karena semua sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat *p*-NPP. Pada konsentrasi tersebut merupakan laju reaksi maksimum (V_{maks}) enzim. Pada konsentrasi substrat *p*-NPP (*para*-nitrofenolpalmitat) 500 μM

merupakan laju reaksi maksimum (V_{maks}) ekstrak lipase pankreas (Putri *et al.*, 2010).

Pada hasil pengamatan uji aktivitas substrat *p*-NPP terhadap senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat diperoleh kurva *Lineweaver-Burk*. Kurva *Lineweaver-Burk* dapat diperoleh dengan membuat grafik antara $1/[S]$ sebagai sumbu x dan $1/V_o$ sebagai sumbu y. Kurva *Lineweaver-Burk* senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Kurva *Lineweaver-Burk* senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Pada kurva *Lineweaver-Burk* dapat diperoleh tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas. Tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak lipase pankreas merupakan tipe inhibisi campuran / nonkompetitif. Hal ini disebabkan karena kurva aktivitas substrat tanpa inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memotong kurva aktivitas substrat dengan adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin tepat pada sumbu x, dimana tipe kurva ini merupakan tipe kurva inhibisi campuran. Tipe inhibitor campuran senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin juga dapat

ditunjukkan dari nilai tetapan *Michaelis-Menten* (K_M) pada kurva aktivitas substrat tanpa inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sama dengan kurva aktivitas substrat dengan adanya inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Tipe campuran senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin berarti senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat berikatan pada sisi aktif enzim lipase dan bersaing dengan substrat *p*-NPP, atau berikatan dengan sisi regioselektif enzim lipase dan mengubah konformasi enzim sehingga menghalangi pengikatan enzim dengan substrat (Voet *et al.*, 2011). Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki nilai tetapan *Michaelis-Menten* (K_M) sebesar 333 μM dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) sebesar 0,0128 $\mu\text{M}/\text{menit}$ (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 7). Nilai tetapan *Michaelis-Menten* (K_M) merupakan nilai khas yang dimiliki inhibitor senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase dari ekstrak lipase pankreas.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terbukti mampu menghambat aktivitas ekstrak lipase pankreas dengan persentase inhibisi sebesar 49,11% pada konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin adalah tipe inhibisi campuran / nonkompetitif. Adanya kemampuan inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase secara *in vivo*. Senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin juga dapat dilakukan uji toksisitasnya terhadap hewan uji untuk mengetahui toksisitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dalam tubuh. Adanya uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

terhadap aktivitas enzim lipase secara *in vivo* dan uji toksisitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin nantinya diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai aplikasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebagai senyawa obat.

BAB V**KESIMPULAN DAN SARAN****5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan pada penelitian ini maka dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Sintesis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dari logam tembaga(II)-asetat hidrat dan ligan kurkumin hidrat dilakukan dengan perbandingan mol sebesar 1 : 2. Karakteristik senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin memiliki titik leleh pada 276 °C, panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 428 nm, ikatan logam dengan ligan ditunjukkan pada vibrasi ikatan Cu-O pada 479 cm^{-1} , dan momen magnet efektif (μ_{eff}) sebesar 2,613 BM.
2. Dari hasil penelitian diketahui penambahan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat menghambat aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas sebesar 49,11 % pada konsentrasi 50 $\mu g/mL$.
3. Tipe penghambatan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas adalah tipe inhibisi campuran / nonkompetitif.

5.2 Saran

Penelitian senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin masih perlu dikembangkan dan diteliti lebih lanjut. Pada penelitian lebih lanjut dilakukan uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase secara *in vivo* dan uji toksisitas kompleks Cu(II)-kurkumin. Adanya uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas enzim lipase secara *in vivo* dan uji toksisitas senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin nantinya diharapkan dapat memberikan pengetahuan mengenai aplikasi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebagai senyawa obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B. B., 2010, **Targeting Inflammation-Induced Obesity and Metabolic Diseases by Curcumin and Other Nutraceuticals**, *Annual Review of Nutrition* 30 : 173–99
- Alappat, L., Awad, A. B., 2010, **Curcumin and Obesity: Evidence and Mechanisms**. *Nutrition Review*, 68 : 729–38
- Anonim, 2012, **Curcumin, Curcuma longa (High Purity)**, *Material Safety Data Sheet*, http://www.biovision.com/manuals/1850_MSDS.pdf, diakses pada tanggal 03 Agustus 2012, pukul 07.56 WIB
- Anonim, 2016, **Copper(II) Acetate Monohydrate**, *Merck*, http://www.merckmillipore.com/ID/id/product/Copper%28II%29-acetate-monohydrate,MDA_CHEM-102710, diakses pada tanggal 20 Juli 2016, pukul 17.30 WIB
- Anonim, 2016, **Solvent**, *Wikipedia*, <https://en.wikipedia.org/wiki/Solvent>, diakses pada tanggal 01 Agustus 2016, pukul 22.19 WIB
- Archana, P., Sathishkumar, N., Bharathi, N., 2010, **In Silico Docking Analysis of Curcumin – An Inhibitor for Obesity**, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1 (4) B224-B235
- Arredondo, M., Núñez, M. T., 2005, **Iron and Copper Metabolism**, *Molecular Aspects of Medicine*, 26 (4-5 SPEC. ISS.) 313-327
- Bahera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., Banerjee, S., 2012, **UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation**, *Journal of Anal Bioanal Techniques*, 3 (6) 1-6
- Barik, A., Mishra, B., Kunwar, A., Kadam, R. M., Shen, L., Dutta, S., Padhye, S., Satpati, A. K., Zhang, H. Y., Priyadarsini, K. I., 2007, **Comparative Study of Copper(II)-curcumin Complexes as Superoxide Dismutase Mimics and Free Radical Scavengers**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 : 431-439
- Baruch, A., Jeffery, D. A., Bogoy, M., 2004, **Enzyme Activity – It's All About Image**, *Trends in cell Biology*, 14 (1)
- Bertinato, J., L'Abbé, Mary R., 2004, **Maintaining Copper Homeostasis: Regulation of Copper-Trafficking Proteins In Response to Copper Deficiency or Overload**, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (6) 316-322

- Bradford, P. G., 2013, **Curcumin and Obesity**, *Bio Factors (Oxford, England)*, 39 (1) 78-87
- Burgos-Morón, E., Calderón-Montaña, J. M., Salvador, J., Robles, A., López-Lázaro, M., 2010. **The Dark Side of Curcumin**. *International Journal Cancer*, 126 : 1771–1775
- Coelho, D. F., Pereira-Lancha, L.O., Chaves, D.S., Diwan, D., Ferraz, R., Campos-Ferraz, P.L., Poortmans, J.R., Lancha Junior, A.H., 2011, **Effect of High-Fat Diets On Body Composition, Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity, and The Role of Exercise On These Parameters**, *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44 (10) 966-972
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., Meydani M., 2009, **Curcumin Inhibits Adipogenesis In 3T3-L1 Adipocytes and Angiogenesis and Obesity In C57/BL Mice**, *Journal Nutrition*, 139 : 919–25
- Fontes, R., Riberio, J. M., Sillero. A., 2000, **Inhibition and Activation of Enzymes. The Effect of a Modifier on The Reaction Rate and on Kinetic Parameters**, *Acta Biochimica Polonica*, 47 (1)
- Han, L. K., Kimura, Y., Okuda, H., 2005, **Anti-Obesity Effects of Natural Products**, *Studies in Natural Products Chemistry*, 30 : 79–110
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J., Vinod, T. K., 2012, **Melting Point Determination**, *Organic Chemistry: A Short Course, 13th ed.*, Houghton-Mifflin, Boston, <http://www.clemson.edu/ces/chemistry/organic/Labs/2270Docs/MeltingPoint.pdf>, diakses pada tanggal 07 Juni 2016, pukul 21.31 WIB
- Hegedus, D. D., Khachatourians, G. G., 1988, **Production of an Extracellular Lipase by *Beauveria Bassiana***, *Biotechnology Letters*, 10 (9) 637-642
- Imaduddin, A. M., 2015. Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks dari Ion $[\text{Co}(\text{C}_9\text{H}_7\text{N})_2]^{2+}$ dan $[\text{Zn}(\text{NCS})_4]^{2-}$, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Malang
- Itokawa, H., Shi, Q., Akiyama, T., Morris-Natschke, Susan, L., Lee, Kuo, H., 2008, **Recent Advances In The Investigation of Curcuminoids**, *Chinese Medicine*, 3 (11)
- Kanwar, Shamsheer, S., Kaushal, R. K., Jawed, A., Gupta, R., Chimni, Swapandeep, S., 2005, **Method for Inhibitor of Residual Lipase in Colorimetric Assay : A Comparative Study**, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42 : pp. 233-pp. 237

- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L., Fujiwara, N., 2006, **Purification and Characterization of An Alkaline Lipase From Pseudomonas Aeruginosa Isolated From Putrid Mineral Cutting Oil as Component of Metalworking Fluid**, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102 (2) 82-89
- Kharomah, F. R., Ersam, T., 2015, **Santon Diprenilasi dari Kayu Akar Garcinia tetranda Pierre**, *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 4 (2) 2337-3520
- Kojima, Y., Shimizu, S., 2003, **Purification and Characterization of The Lipase From Pseudomonas Fluorescens HU380**, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (3) 219-226
- Kong, Y., Ma, W., Liu, X., Zu, Y., Fu, Y., Wu, N., Liang, L., Yao, L., Efferth, T., 2009, **Cytotoxic Activity of Curcumin towards CCRF-CEM Leukemia Cells and Its Effect on DNA Damage**, *Molecules*, (14) 5328-5338
- Lau, D. C.W., Douketis, J. D., Morrison, Katherine, M., Hramiak, I. M., Sharma, A. M., 2007, **2006 Canadian Clinical Practice Guidelines On The Management and Prevention of Obesity In Adults and Children**, *Canadian Medical Association Journal*, 176 (8Sppl) S1-S13
- LeFevre, J. W., 2004, **Measuring the Melting Point and Compounds and Mixture**, Editor : Jeffers, J., *CER Modular Laboratory Program in Chemistry*, SUNNY, Oswego, <http://www.chm.uri.edu/bdeboef/Day%203%20Melting%20Point%20and%20IR%20Experiment.PDF>, diakses pada tanggal 30 November 2015, pukul 16.30 WIB
- Lunagariya, N. A., Petel, N. K., Jagtap, S. C., Bhutani, K. K., 2014, **Inhibitors of Pancreatic Lipase : State of The Art and Clinical Persepectives**, *Experimental and Clinical Sciences Journal*, (13) 897-921
- Lowe, M. E., 1997, **Structure and Function of Pancreatic Lipase and Colipase**, *Annual Review of Nutrition*, 17 : 141-58
- Matthey, J., 2004, *Introductin Manual Magnetic Suscaptibility Balance (MSB) Mk I*, Fabricated Equipment 456 Devon Park Drive Wayne, United States
- Miessler, G. L., Fischer, P. J., Tarr, D. A., 2014, *Inorganic Chemistry Fifth Edition*, Pearson Education, New York
- Mohamed, G.I A., Ibrahim, Sabrin R. M., Elkhayat, E. S., El Dine, R. S., 2014, **Natural Anti-Obesity Agents**, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, (52) 269-284

- Mubaroh, 2008, Sintesis dan Karakterisasi Garam Rangkap Kalsium Tembaga (II) Asetat Heksahidrat $\text{CaCu}(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *Tesis*, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Teknologi Bandung, Bandung
- Murnah, 2012, **Kajian Spektra Inframerah dan UV Minyak Atsiri dari Umbi Teki (*Cyberus rotundus* Linn.)**, *Media Medika Indonesia*, 46 (1) 44-50
- Noviyanti, T., Ardiningsih, P., Rahmalia, W., 2012, **Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels)**, *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1 (1) 31-34
- Pertiwi, M. F. D., Susanto, W. H., 2014. **Pengaruh Proporsi (Buah : Surkosa) dan Lama Osmosis Terhadap Kualitas Sari Buah Stroberi (*Fragaria vesca* L.)**, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2 (2) 82-90
- Pongchaidecha, A., Lailerd, N., Boonprasert, W., Chattipakorn, N., 2009, **Effects of Curcuminoid Supplement On Cardiac Autonomic Status In High-Fat-Induced Obese Rats**, *Journal Nutrition*, 25 : 870–878
- Pratiwi, D., Sebayang, F., Jamilah, I., 2013, **Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung Serta Kofaktor Na^+ dan Co^{2+}** , *Jurnal Sainia Kimia*, 1 (2)
- Putri, W. S., Supriyanti, F. M. T., Zackiyah, 2010, **Penentuan Aktivitas dan Jenis Inhibisi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Artocarpus heterophyllus* Lamik sebagai Inhibitor Tirosinase**, *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia*, 1 (1) 94-99
- Puska, P., Nishida, C., Porter, D., 2003, *Obesity and Overweight*, World Health Organization, New York
- Refat, M. S., 2013, **Synthesis and Characterization of Ligational Behavior of Curcumin Drug Towards Some Transition Metal Ions: Chelation Effect On Their Thermal Stability and Biological Activity**, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 105 : 326–337
- Robinson, N. J., Winge, D. R., 2010, **Copper Metallochaperones.**, *Annual Review of Biochemistry*, 79 : 537-562
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Villo, L., Nicolosi, G., Pastor, F. I. J., Diaz, P., Saso, L., 2006, **Inhibition of *Candida rugosa* Lipase by Saponins, Flavonoids and Alkaloids**, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*, 40 : 138-143

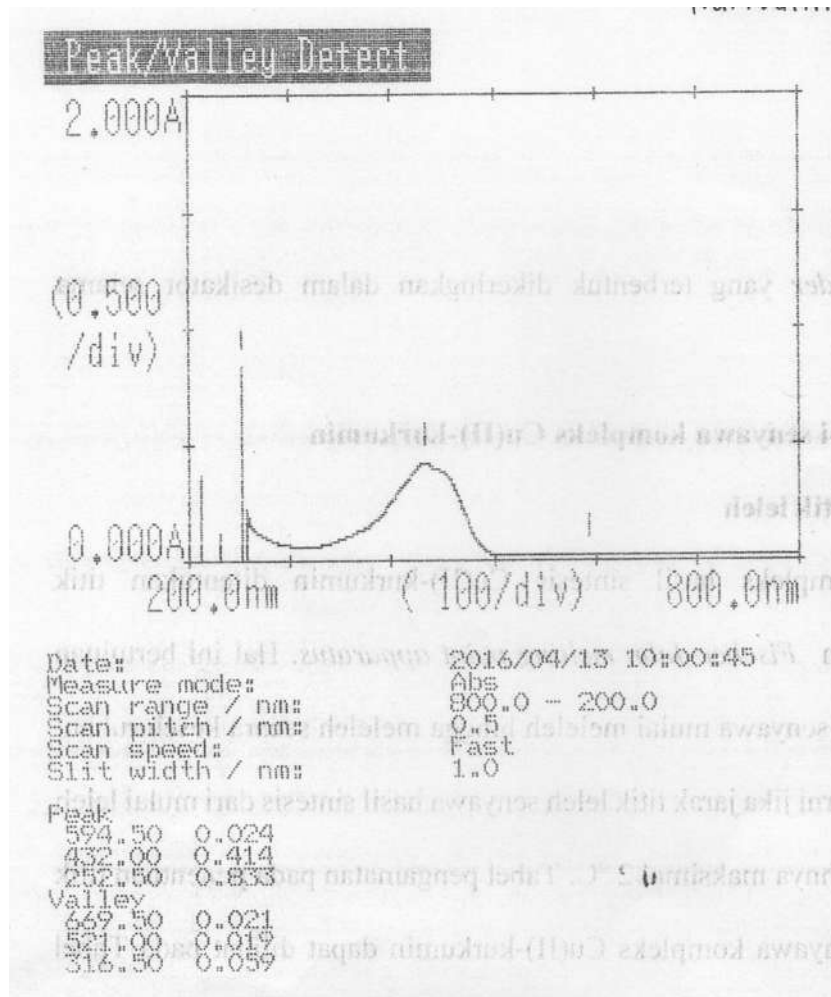
- Salleh, A. B., Zaliha, R. N., Rahman, R. A., 2006, *New Lipase and Protease*, Nova Science Publishers, Inc., New York
- Scopes, R. K., 2002, **Enzyme Activity and Assays**, *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan, Victoria
- Shahani, K. M., Khan, M. I., Chandan, R. C., 1975, **Bovine Pancreatic Lipase 1 . I. Isolation, Homogeneity, and Characterization**, *Journal of Dairy Science*, 59 (3) 369 – 375
- Sherma, R., Chistib, Y., Banerjee, U. C., 2001, **Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases**, *Biotechnology Advances*, 19 : 627–662
- Stuart, B., 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York
- Sumardjo, D., 2006, *Pengantar Kimia*, Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta
- Swastika, L. N., Martak, F., 2012, **Sintesis dan Sifat Magnetik Kompleks Ion Logam Cu(II) dengan Ligan 2-Feniletilamin**, *Jurnal Sains dan Seni Publikasi Ilmiah Online Mahasiswa ITS*, 1 (1) 1-5
- Tanaka, H., Mireau, I., Ito, F., 1999, **Purification and Characterization of Bovine Pancreatic Bile Salt-Activated Lipase**, *Journal of Biochem*, 125 (5) 883-890
- Triyati, E., 1985, **Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya Dalam Oseanologi**, *Oseana*, X (1) 39 – 47
- Voet, D., Voet, J. G., 2011, *Biochemistry Fourth edition*, John Wiley & Sons, New York
- Wang, H., Storlien, L. H., Huang, X. F., 2002, **Effects of Dietary Fat Types On Body Fatness, Leptin, and ARC Leptin Receptor, NPY, and AgRP mRNA Expression**, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, (282) E1352-E1359
- Wanninger, S., Lorenz V., Subhanb, A., Edelmann, F. T., 2015, **Metal Complexes of Curcumin – Synthetic Strategies, Structures and Medicinal Applications**, *Chemical Society Review*, 44 : 4986-5002
- Widianingrum, Miskiyah, Suismono, **Bahaya Kontaminasi Logam Berat Dalam Sayuran dan Alternatif Pencegahan Cemarannya**, *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*, Vol. 3,

http://pascapanen.litbang.pertanian.go.id/assets/media/publikasi/bulletin/2007_3.pdf, diakses pada tanggal 02 Agustus 2016, pukul 7.08 WIB

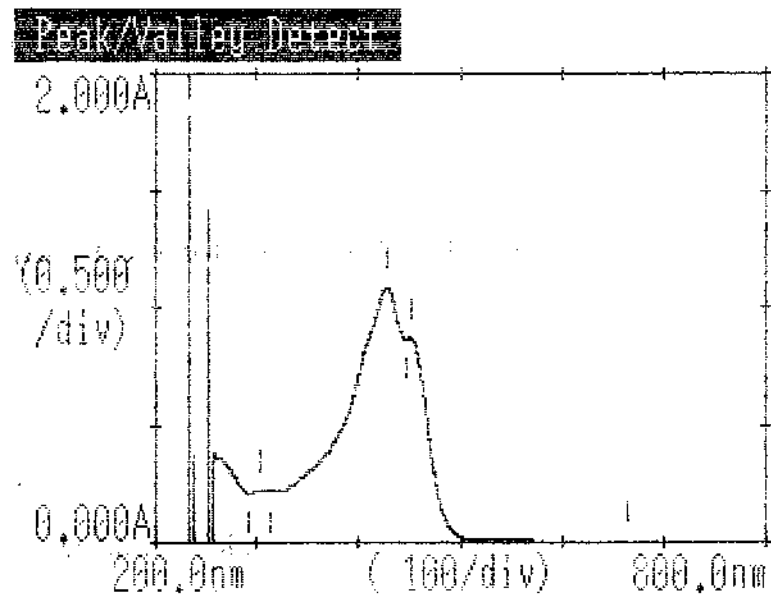
- Widoretno, S., Santoso, 2000, **Pengaruh Penambahan Ion Cu (Cu^{2+}) dan Nitrat terhadap Penambatan Nitrogen pada Kacang Tanah (*Arachis hypogaea L.*)**, *Biosmart*, 2 (1) 34-40
- Yusriah, Kuswytasari N. D., 2013, **Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Protease *Penicillium sp.***, *Jurnal Sains dan Seni Publikasi Ilmiah Online Mahasiswa ITS*, 2 (1) 2337-3520
- Zhao, X. Z., Jiang, T., Wang, L., Yang, H., Zhang, S., Zhou, P., 2010, **Interaction of Curcumin with Zn(II) and Cu(II) Ions Based On Experiment and Theoretical Calculation**, *Journal of Molecular Structure*, 984 : 316–325

LAMPIRAN

1. Lampiran 1 : Spektra UV-Vis

1.1 Spektrum UV-Vis ligan kurkumin 10^{-5} M (pelarut dimetil sulfoksida)

1.2 Spektrum UV-Vis senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin 10^{-5} M (pelarut dimetil sulfoksida)

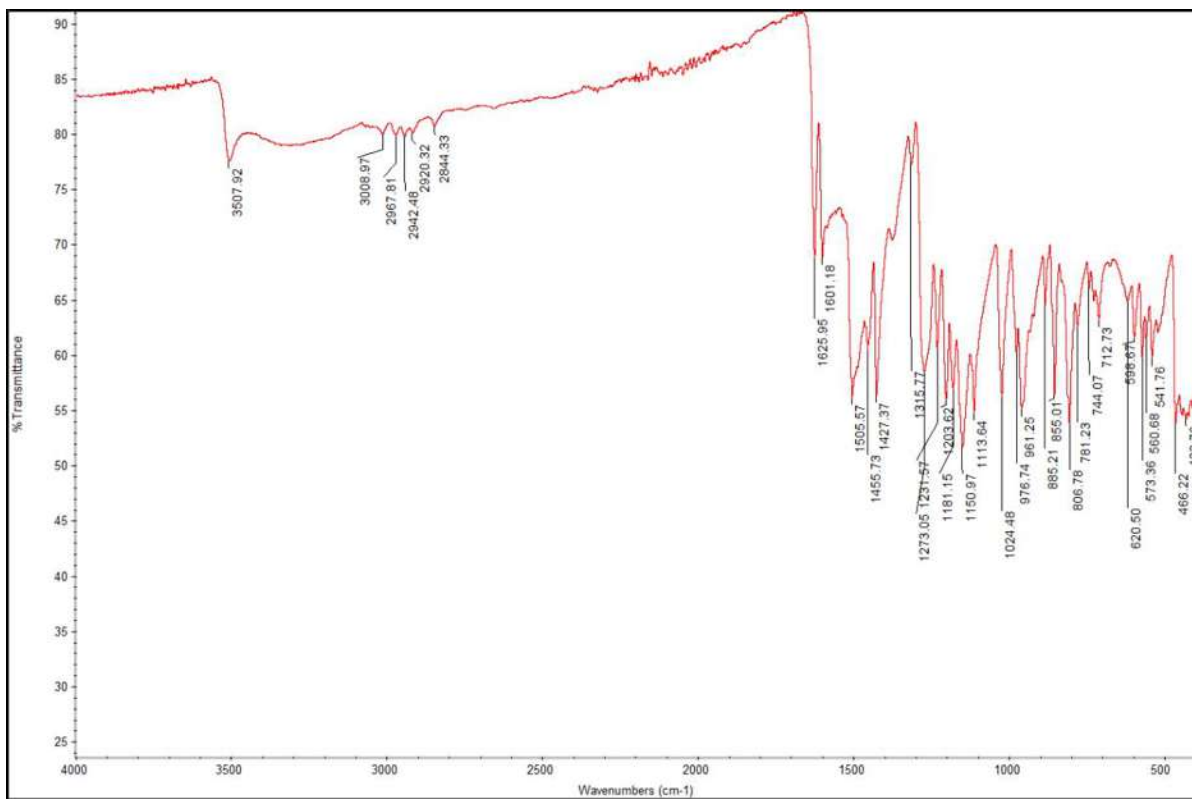


Date: 2016/04/13 10:14:38
 Measure mode: Abs
 Scan range / nm: 200.0 - 200.0
 Scan pitch / nm: 0.5
 Scan speed: Fast
 Slit width / nm: 1.0

Peak:
 665.50 0.003
 451.00 0.871
 443.00 1.864
 304.50 0.212
 293.50 1.810
 Valley:
 661.00 0.003
 443.50 0.865
 314.00 0.215
 292.50 0.210

2. Lampiran 2 : Hasil FTIR

2.1 Hasil FTIR ligan kurkumin



Collection time: Tue May 10 10:06:19 2016 (GMT+0)

Tue May 10 10:07:26 2016 (GMT+07:00)

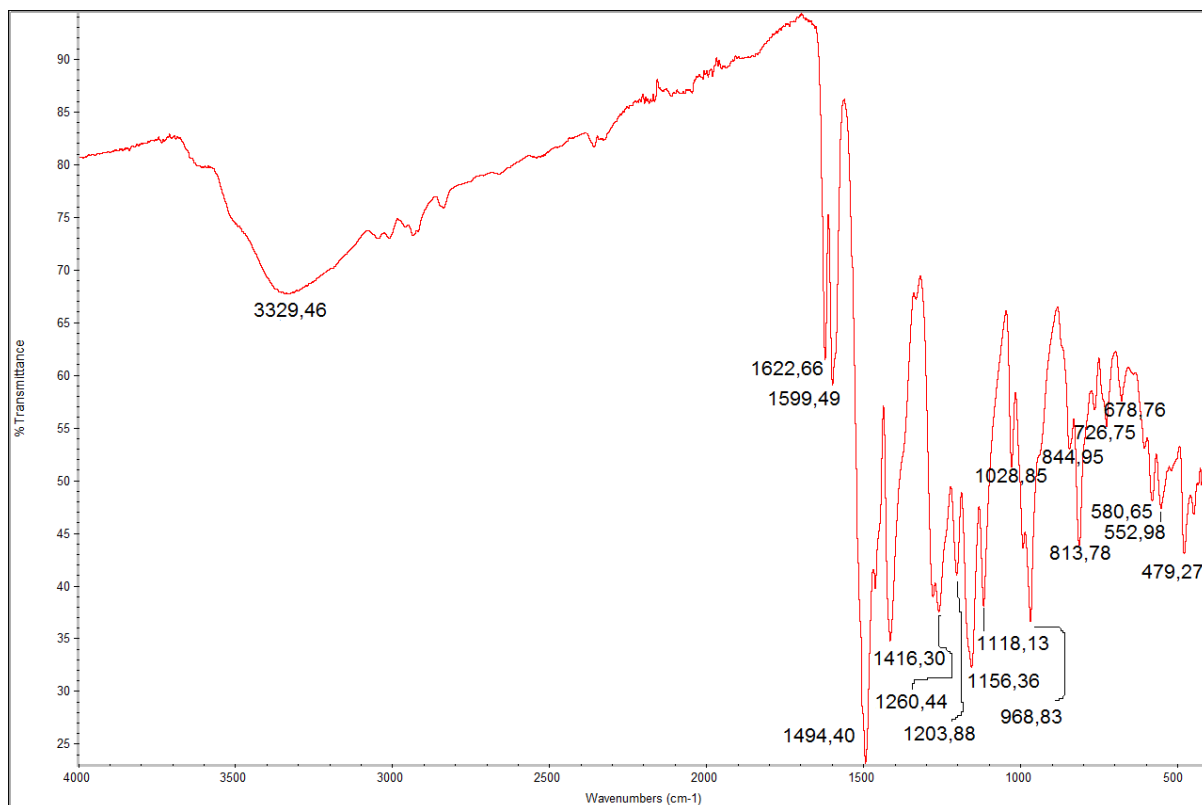
FIND PEAKS:

Spectrum: Shofa
 Region: 4000.00 400.00
 Absolute threshold: 81.561
 Sensitivity: 50

Peak list

Position	Intensity
432.76	54.142
466.22	53.770
541.76	59.658
560.68	61.354
573.36	59.726
598.67	61.587
620.50	64.790
712.73	63.180
744.07	65.968
781.23	62.566
806.78	53.712
855.01	56.383
885.21	64.473
961.25	55.048
976.74	60.091
1024.48	56.173
1113.64	54.700
1150.97	51.536
1181.15	56.927
1203.62	55.809
1231.57	60.516
1273.05	58.398
1315.77	77.195
1427.37	56.295
1455.73	60.472
1505.57	56.165
1601.18	68.805
1625.95	68.749
3507.92	77.539

2.2 Hasil FTIR senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin



Collection time: Thu Jun 16 10:24:33 2016 (GMT+0)

Thu Jun 16 10:26:03 2016 (GMT+07:00)

FIND PEAKS:

Spectrum: Thu Jun 16 10:24:16 2016 (GMT+07:00)

Region: 4000.00 400.00

Absolute threshold: 68.796

Sensitivity: 50

Peak list:

Position: 479.27	Intensity: 42.914
Position: 552.98	Intensity: 47.190
Position: 580.65	Intensity: 47.927
Position: 678.76	Intensity: 57.449
Position: 726.75	Intensity: 54.984
Position: 813.78	Intensity: 43.709
Position: 844.95	Intensity: 52.871
Position: 968.83	Intensity: 38.475
Position: 1028.85	Intensity: 51.159
Position: 1118.13	Intensity: 37.960
Position: 1156.36	Intensity: 32.112
Position: 1203.88	Intensity: 40.883
Position: 1260.44	Intensity: 37.412
Position: 1416.30	Intensity: 34.588
Position: 1494.40	Intensity: 23.018
Position: 1599.49	Intensity: 58.907
Position: 1622.66	Intensity: 61.329
Position: 3329.46	Intensity: 67.585

3. Lampiran 3 : Hasil *Magnetic Susceptibility Balance* (MSB)

Data hasil pengamatan MSB logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

No	Senyawa	R ₀	R ₁	m ₀ (gram)	m ₁ (gram)	l (cm)	T (K)	C _{bal}	μ _{eff} (BM)
1	Tembaga(II) asetat hidrat	-320	-250	0,8128	0,8970	1,7	301	3,39	1,518
2	kurkumin	-340	-350	0,8127	0,8790	2,0	301	3,39	-
3	Cu(II)-kurkumin	-360	-340	0,8051	0,8471	2,2	300	3,39	2,613

3.1 Hasil MSB logam Cu(II) dari tembaga(II) asetat hidrat

Nilai suseptibilitas massa (χ_g) dihitung berdasarkan data hasil pengukuran.

$$\begin{aligned}\chi_g &= \frac{C_{bal} \times l \times (R_1 - R_0)}{10^9 \times (m_1 - m_0)} \\ &= \frac{3,39 \times 1,7 \times (-250 - (-320))}{10^9 \times (0,8970 - 0,8128)} \\ &= 4,79 \times 10^{-6}\end{aligned}$$

Nilai suseptibilitas molar (χ_m) ditentukan dari hasil perhitungan nilai suseptibilitas massa (χ_g).

$$\begin{aligned}\chi_m &= \chi_g \times Mr_{\text{Cu(II)-kurkumin}} \\ &= 4,79 \times 10^{-6} \times 199,65 \\ &= 9,565 \times 10^{-4}\end{aligned}$$

Nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) ditentukan dari hasil perhitungan nilai suseptibilitas molar (χ_m).

$$\begin{aligned}\mu_{\text{eff}} \text{ (BM)} &= 2,83 \sqrt{[(\chi_m - \Delta) \times T]} \\ &= 2,83 \sqrt{[(9,565 \times 10^{-4}) \times 301]} \\ &= 1,518\end{aligned}$$

3.2 Hasil MSB ligan kurkumin

Nilai suseptibilitas massa (χ_g) dihitung berdasarkan data hasil pengukuran.

$$\begin{aligned}\chi_g &= \frac{C_{bal} \times l \times (R_1 - R_0)}{10^9 \times (m_1 - m_0)} \\ &= \frac{3,39 \times 2,0 \times (-350 - (-340))}{10^9 \times (0,8790 - 0,8127)} \\ &= -1,023 \times 10^{-6}\end{aligned}$$

Nilai suseptibilitas molar (χ_m) ditentukan dari hasil perhitungan nilai suseptibilitas massa (χ_g).

$$\begin{aligned}\chi_m &= \chi_g \times Mr_{\text{Cu(II)-kurkumin}} \\ &= -1,023 \times 10^{-6} \times 368,38 \\ &= -3,78 \times 10^{-4}\end{aligned}$$

Nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) ditentukan dari hasil perhitungan nilai susceptibilitas molar (χ_m).

$$\begin{aligned}\mu_{\text{eff}} \text{ (BM)} &= 2,83 \sqrt{[(\chi_m - \Delta) \times T]} \\ &= 2,83 \sqrt{[(-3,78 \times 10^{-4}) \times 301]} \\ &= -\end{aligned}$$

3.3 Hasil MSB senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Nilai susceptibilitas massa (χ_g) dihitung berdasarkan data hasil pengukuran.

$$\begin{aligned}\chi_g &= \frac{C_{\text{bal}} \times l \times (R_1 - R_0)}{10^9 \times (m_1 - m_0)} \\ &= \frac{3,39 \times 2,2 \times (-340 - (-360))}{10^9 \times (0,8471 - 0,8051)} \\ &= 3,55 \times 10^{-6}\end{aligned}$$

Nilai susceptibilitas molar (χ_m) ditentukan dari hasil perhitungan nilai susceptibilitas massa (χ_g).

$$\begin{aligned}\chi_m &= \chi_g \times \text{Mr}_{\text{Cu(II)-kurkumin}} \\ &= 3,55 \times 10^{-6} \times 800,30 \\ &= 2,84 \times 10^{-3}\end{aligned}$$

Nilai momen magnet efektif (μ_{eff}) ditentukan dari hasil perhitungan nilai susceptibilitas molar (χ_m).

$$\begin{aligned}\mu_{\text{eff}} \text{ (BM)} &= 2,83 \sqrt{[(\chi_m - \Delta) \times T]} \\ &= 2,83 \sqrt{[(2,84 \times 10^{-4}) \times 300]} \\ &= 2,6132\end{aligned}$$

Nilai momen magnet (μ) senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat ditentukan dari jumlah elektron tidak berpasangan (n). Jumlah elektron tidak berpasangan (n) pada senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin sebesar 1.

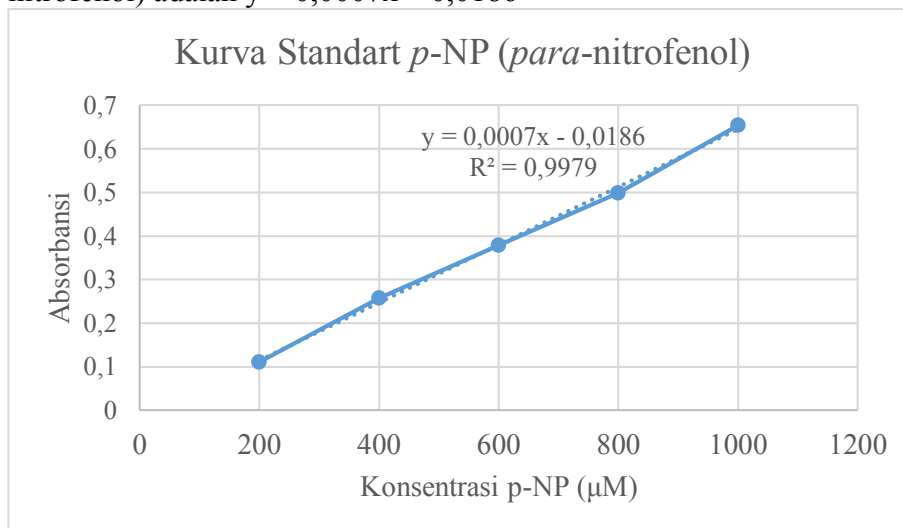
$$\begin{aligned}\mu \text{ (BM)} &= \sqrt{n(n+2)} \\ &= \sqrt{1(1+2)} \\ &= 1,73\end{aligned}$$

4. Lampiran 4 : Kurva standart *p*-NP (*para*-nitrofenol)

Larutan standart *p*-NP (*para*-nitrofenol) 20000 μM diukur pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 410 nm.

Larutan kerja <i>p</i> -NP (μM) (x)	Absorbansi (y)
200	0,111
400	0,257
600	0,378
800	0,499
1000	0,654

Dari tabel tersebut diperoleh nilai persamaan regresi kurva standart *p*-NP (*para*-nitrofenol) adalah $y = 0,0007x - 0,0186$



5. Lampiran 5 : Penentuan suhu dan pH optimum ekstrak kasar lipase pankreas

Nilai absorbansi pada pengukuran suhu dan pH optimum ekstrak kasar lipase pankreas.

Suhu	pH <i>buffer</i> fosfat		
	6,0	7,0	8,0
27 °C	0,0180	0,0465	0
37 °C	0,0755	0,1795	0,0610
47 °C	0	0,0800	0,0450

Konsentrasi *p*-NP (*para*-nitrofenol) dapat diketahui dengan mensubstitusikan nilai absorbansi pada persamaan regresi linier $y = 0,0007x - 0,0186$. Aktivitas enzim lipase dapat diperoleh dari persamaan,

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000}{t \times 100}$$

Sehingga diperoleh aktivitas enzim lipase pada penentuan suhu dan pH optimum ekstrak kasar lipase pankreas.

Suhu	pH <i>buffer</i> fosfat		
	6,0	7,0	8,0
27 °C	0,0275	0,0489	0
37 °C	0,0708	0,1491	0,0599
47 °C	0	0,0742	0,0957

6. Lampiran 6 : Uji inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

6.1 Uji aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas

Absorbansi = 0,3490

Persamaan regresi linier *p*-NP (*para*-nitrofenol) yang diperoleh yakni $y = 0,0007x - 0,0186$, maka nilai x dapat diketahui dengan mensubstitusi nilai absorbansi menjadi y ,

$$\begin{aligned} y &= 0,0007x - 0,0186 \\ 0,3490 &= 0,0007x - 0,0186 \\ 0,3490 + 0,0186 &= 0,0007x \\ x &= 0,5536 \mu\text{M} \end{aligned}$$

Setelah diperoleh konsentrasi *p*-NP dengan perhitungan diatas, maka aktivitas enzim lipase dapat ditentukan menggunakan persamaan :

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas lipase (U/mL)} &= \frac{[\text{p-NP}] \times 1000}{t \times 100} \\ &= \frac{0,5536 \times 1000}{20 \times 100} \\ &= 0,2768 \text{ Unit/mL} \end{aligned}$$

6.2 Uji inhibisi logam Cu(II), ligan kurkumin, dan senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin terhadap aktivitas ekstrak kasar lipase pankreas

Inhibitor	$\mu\text{g/mL}$	Absorbansi		Selisih Absorbansi	[p-NP]	Aktivitas (U/mL)	Inhibisi (%)
		Kontrol	Sampel				
Cu(II)	0	0,485	0,835 0,833	0,349	0,5536	0,2768	0
	50	0,523	0,859 0,857	0,335	0,5325	0,2663	3,8
	100	0,485	0,809 0,814	0,3265	0,5197	0,2599	6,12
	200	0,537	0,775 0,782	0,2415	0,3917	0,1958	29,2
Kurkumin	0	0,485	0,835 0,833	0,349	0,5536	0,2768	0
	50	0,624	0,846 0,848	0,223	0,3638	0,1819	34,28
	100	1,12	1,219 1,232	0,109	0,1921	0,096	65,32
	200	1,161	0,912 0,929	-0,2405	0	0	100
Cu(II)-kurkumin	0	0,485	0,835 0,833	0,349	0,5536	0,2768	0
	50	1,1	1,254 1,283	0,1685	0,2817	0,1408	49,11
	100	1,039	1,117 1,126	0,0825	0,1522	0,0761	72,51
	200	0,931	0,801 0,803	-0,129	0	0	100

$$\text{Aktivitas lipase (U/mL)} = \frac{[p\text{-NP}] \times 1000}{t \times 100}$$

Keterangan :

[p-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

$$\text{Presentase inhibisi (\%)} = \frac{\text{aktivitas (E+S)} - \text{aktivitas (E+S+I)}}{\text{aktivitas (E+S)}} \times 100\%$$

Keterangan :

(E+S) : tanpa penambahan inhibitor

(E+S+I) : dengan penambahan inhibitor

7. Lampiran 7 : Penentuan tipe inhibisi senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin

Prihal	[p-NPP]	Absorbansi		Selisih Abs.	[p-NP]	Laju reaksi awal ($\mu\text{M}/\text{menit}$)	1/S ($\times 10^4$)	1/V ₀
		Kontrol	Sampel					
Tanpa Inhibitor	100	0,413	0,509 0,508	0,0955	0,1717	0,008585	100	116,48
	200	0,471	0,62 0,623	0,1505	0,2545	0,012725	50	78,58
	300	0,444	0,694 0,712	0,259	0,418	0,0209	33	47,85
	400	0,483	0,767 0,78	0,2905	0,4655	0,023275	25	42,96
	500	0,418	0,706 0,719	0,2945	0,4715	0,023575	20	42,42
	600	0,544	0,84 0,841	0,2865	0,4595	0,022975	17	43,52
Cu(II)-kurkumin	100	0,498	0,524 0,515	0,0219	0,06084	0,003042	100	328,73
	200	0,435	0,477 0,474	0,04	0,0881	0,004405	50	227,01
	300	0,661	0,711 0,715	0,052	0,1062	0,00531	33	188,32
	400	0,433	0,525 0,523	0,091	0,1649	0,008245	25	121,28
	500	0,645	0,735 0,744	0,0945	0,1702	0,00851	20	117,51
	600	0,642	0,734 0,73	0,09	0,1634	0,00817	17	122,40

Selisih serapan (absorbansi) = serapan rata-rata – serapan kontrol
 $= (A_{(\text{rata-rata})} - A_{(\text{kontrol})})$

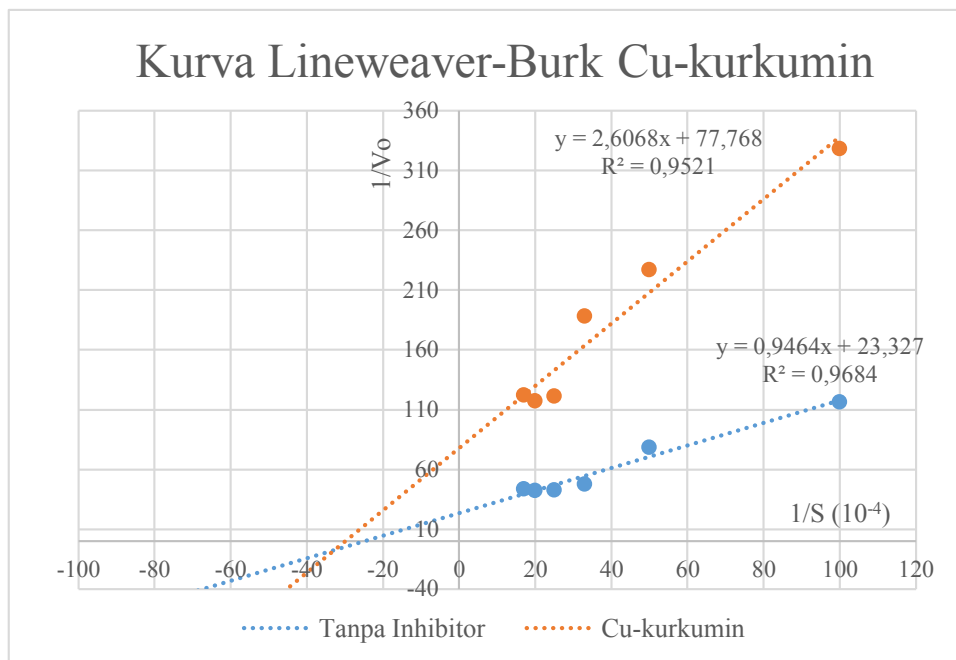
$$\text{Laju reaksi awal } (\mu\text{M}/\text{menit}) = \frac{[p\text{-NP}]}{t}$$

Keterangan :

[p-NP] : Konsentrasi *p*-nitrofenol (μM)

t : waktu inkubasi (20 menit) (menit)

Kurva *Lineweaver-Burk* senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin dapat ditentukan dari $1/S$ sebagai sumbu x dan $1/V_0$ sebagai sumbu y.



Nilai konstanta Michaelis-Menten (K_M) dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) ditentukan melalui persamaan,

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{aK_M}{V_{maks}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{a'}{V_{maks}}$$

Nilai konstanta *Michaelis-Menten* (K_M) dapat ditentukan dari *slope* dan laju reaksi maksimum (V_{maks}) dapat ditentukan dari *intercept* pada persamaan regresi linier kurva *Lineweaver-Burk* senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin. Persamaan regresi linier kurva *Lineweaver-Burk* senyawa kompleks Cu(II)-kurkumin yaitu $y = 2,6068x + 77,768$,

- $Intercept = \frac{1}{V_{maks}}$
 $77,768 = \frac{1}{V_{maks}}$
 $V_{maks} = \frac{1}{77,768}$
 $V_{maks} = 0,0128 \mu\text{M}/\text{menit}$
- $Slope = \frac{K_M}{V_{maks}}$
 $2,6068 = \frac{K_M}{0,0128}$
 $K_M = 0,0333 (x 10^4) \mu\text{M}$