

# MEKANISME DAN KINETIKA QUENCHING OKSIGEN SINGLET DARI SENYAWA FENOLIK DAUN CENGKEH TERHADAP FOTOKSIDASI YANG DISENSITASI OLEH ERITROSIN

Mechanism and Kinetics of Singlet Oxygen Quenching of Phenolic Compound from Clove Leaf (*Eugenia Caryiophyllata* Thumb) on Photooxidation Sensitized by Erythrosine

Edi Suryanto, Johnly A. Rorong, Dewa Gede Katja

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi, Kampus Unsrat,  
Bahu Manado 95115  
Email: edisuryanto@yahoo.com

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa fenolik dalam daun cengkeh dan mempelajari mekanisme dan kinetika quenching oksigen singlet. Daun cengkeh diekstraksi dengan cara destilasi uap menggunakan air selama 6 jam. Minyak daun cengkeh kasar selanjutnya dimurnikan dengan destilasi pengurangan tekanan. Fraksi-fraksi yang terisolasi ditentukan strukturnya dengan metoda infra merah (IR), resonansi magnetik inti ( $^1\text{H}$  NMR), dan spektrometer massa (MS). Efek 0, 500, 1000 dan 1500 ppm eugenol terhadap fotooksidasi asam linoleat (0,03M) yang mengandung 15 ppm eritrosin dalam etanol dipelajari dengan mengukur angka peroksida minyak. Mekanisme dan kinetika quenching oleh eugenol dipelajari dengan metode *steady-state*. Sampel 0;  $0,06 \times 10^{-4}$ ;  $0,12 \times 10^{-4}$ ;  $0,24 \times 10^{-4}$  dan  $0,48 \times 10^{-4}$  mM eugenol dipersiapkan dalam pelarut air yang juga mengandung 0;  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  dan  $136,39 \times 10^{-4}$  mM eritrosin yang disinari oleh cahaya fluoresen (4000 lux) pada suhu kamar selama 15 jam. Hasil analisis kandungan eugenol dari minyak cengkeh, F1, F2, F3 dan F4 berturut-turut adalah 49,68; 54,32; 87,16 dan 73,65%. Kebenaran struktur F3 diidentifikasi dengan spektrometer IR pada serapan kuat  $3448 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus hidroksil dari senyawa fenolik sedangkan pada  $^1\text{H}$  NMR menunjukkan jumlah proton pada cincin aromatik menjadi 3 atom H dan spektrometer massa menunjukkan  $m/e = 164$  sebagai puncak tertinggi dan tidak muncul puncak  $(M-14)^+$  sebagai petunjuk adanya eugenol. Hasil ini menunjukkan bahwa eugenol memiliki aktivitas antifotooksidatif terhadap fotooksidasi asam linoleat yang disensitasi oleh eritrosin. Mekanisme quenching oksigen singlet terhadap fotodegrasi eritrosin oleh eugenol menunjukkan bahwa eugenol hanya menstabilkan oksigen singlet. Konstanta laju quenching oksigen singlet total oleh eugenol adalah  $4,42 \times 10^8 \text{ M/s}$ .

**Kata kunci:** Eugenol, *quencher*, eritrosin, oksigen singlet

## ABSTRACT

The objectives of this research were to isolate phenolic compound of clove leaves and to study the mechanism and kinetic of singlet oxygen quenching. Clove leaves was extracted by steam distillation using water for 6 hours. Crude clove leaves oil was purified by distillation under reduced pressure. Isolated fractions were determined its structure by infrared (IR), nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR), and mass spectrometry (MS) techniques. The effects of 0, 500, 1000 and 1500 ppm isolated compound on the photooxidation of linoleic acid (0,03M) containing 15 ppm erythrosine in ethanol were studied by measuring peroxide value of the oil. The quenching mechanism and kinetics of eugenol were studied by the steady-state kinetic method. Samples of 0;  $0,06 \times 10^{-4}$ ;  $0,12 \times 10^{-4}$ ;  $0,24 \times 10^{-4}$  dan  $0,48 \times 10^{-4}$  mM eugenol prepared in water contained 0;  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  and  $136,39 \times 10^{-4}$  mM of erythrosine stored under fluorescent light (4000 lux) at room temperature for 15 hours. The result indicated that eugenol content of clove oil, F1, F2, F3 and F4 were 49.68; 54.32; 87.16 and 73.65%, respectively. The structure of F3 was identified by IR spectrometry which shows strong absorption at  $3448 \text{ cm}^{-1}$  indicating hydroxyl group from the phenolic compound and the  $^1\text{H}$  NMR spectra showed that the number of proton ring was 3 hydrogen while the mass spectrometry showed the molecular ion peak at  $m/e = 164$  as base peak and the absence of peak at  $(M-14)^+$  as the indicator of eugenol. The result

showed that eugenol had antiphotooxidation activity on erythrosine sensitized photooxidation of oil. The mechanism of singlet oxygen quenching on erythrosine photodegradation showed that eugenol only quenched singlet oxygen. The total quenching rate constant of eugenol was  $4,42 \times 10^8$  M/s.

**Keywords:** Clove leave, eugenol, quencher, erythrosine, singlet oxygen

## PENDAHULUAN

Tanaman cengkeh (*Eugenia caryophyllata* Thumb) termasuk tanaman tropis yang telah dikenal sekitar 2000 tahun yang lalu sebagai bumbu bahan makanan oleh bangsa Asia. Indonesia pernah menjadi penghasil cengkeh terbesar pada abad ke-18 oleh karena itu tanaman cengkeh banyak ditemukan di wilayah Indonesia khususnya di Indonesia bagian timur. Selain bunga, buah, biji dan ranting, daun cengkeh apabila dikeringkan dapat didistilasi untuk memperoleh minyak daun cengkeh yang bernilai ekonomis. Minyak cengkeh dapat diperoleh dari daun cengkeh dengan cara distilasi. Minyak daun cengkeh antara lain tersusun oleh eugenol dan kariofilin (Guenther, 1950). Kualitas minyak cengkeh dapat dilihat dari kandungan eugenolnya.

Eugenol adalah metoksifenol yang memiliki rantai hidrokarbon pendek, ditemukan pada daun, rempah-rempah dan minyak cengkeh yang berasal dari tanaman species *Syzygium* (Koll-mannsberger dan Nitz, 1994). Eugenol telah digunakan sebagai rempah-rempah karena memiliki bau yang sangat kuat dan sebagai antiseptik mulut karena efeknya seperti pembersih. Isoeugenol yang terdapat pada beberapa sayuran, berperan sebagai antioksidan (Rao dkk., 1999), dan juga digunakan sebagai bahan pewangi tambahan pada makanan (Ito dkk., 2004).

Penggunaan rempah-rempah sebagai penghambat oksidasi dalam masakan telah lama terbukti, di samping bahan alam tersebut mudah diperoleh dan aman dikonsumsi serta tidak mempunyai resiko terhadap kesehatan pada konsumen. Dengan demikian penggunaan rempah-rempah menjadi bahan pertimbangan dan kecenderungan meningkatkan ketertarikan konsumen terhadap zat aditif dari bahan alam. Cengkeh adalah salah satu jenis rempah-rempah yang banyak digunakan sebagai bumbu masakan. Penelitian tentang peran cengkeh sebagai bahan antioksidatif yang berfungsi menangkap radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ), radikal anion superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) telah banyak dilakukan (Gulcin dkk., 2004; Ito dkk., 2005; Lee dan Shibamoto, 2000). Namun peran senyawa eugenol yang terdapat dalam daun cengkeh sebagai quencher oksigen singlet belum banyak terungkap. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa fenolik dari daun cengkeh dan mempelajari mekanisme quenching oksigen singlet dari senyawa yang terisolasi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Penelitian

Daun cengkeh diperoleh dari Kabupaten Minahasa Utara. Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam asetat, kalium iodida, natrium tiosulfat, eritrosin, amilum diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). Asam linoleat diperoleh dari Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO). Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, mikropipet, *vortex mixer*, pengaduk magnet, timbangan analitik, botol serum, mikro buret, pengukur intensitas cahaya (light meter, Leybold-Heraeus), 4 buah lampu *flourescent* 15 Watt (Silvania), kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm), seperangkat alat destilasi uap, seperangkat alat destilasi pengurangan tekanan, spektrofotometer UV-Vis (Milton Roy UV-Vis 501), spektrofotometer IR, (Shimadzu FTIR 8201 PC), kromatografi gas-Spektrometer massa dan GC-MS (Shimadzu GC-17 A, OP-5050).

### Ekstraksi Daun Cengkeh dengan Distilasi Uap

Daun cengkeh yang digunakan sebagai sampel adalah daun yang telah gugur. Sampel kemudian dikeringkan selama 20 hari untuk menghilangkan kandungan air. Daun cengkeh yang telah dikeringkan selanjutnya dipotong dengan ukuran 2 mm sebelum dilakukan distilasi uap. Sebanyak 400 g daun cengkeh yang berukuran 2 mm dimasukkan ke dalam tangki distilasi berkapasitas 10 L, selanjutnya diisi dengan air sebanyak 6 L, kemudian dihubungkan dengan seperangkat alat distilasi uap. Dipanaskan pelan-pelan sampai diperoleh distilat, dipindahkan distilat ke dalam corong pisah, lapisan berminyak diambil dan lapisan berair diekstrak dengan petroleum eter. Selanjut pelarutnya diuapkan dengan evaporator, residunya digabung dengan lapisan berminyak. Kandungan senyawa fenolik dalam minyak daun cengkeh diuji dengan metode spektrofotometer menggunakan eugenol murni sebagai standar (Jeong dkk., 2005).

### Isolasi dan Fraksinasi Senyawa Fenolik dari Minyak Daun Cengkeh

Isolasi senyawa fenolik menggunakan 50 g minyak daun cengkeh hasil distilasi dimasukkan ke dalam gelas leher tiga berkapasitas satu liter, ditambahkan dengan NaOH 10

g dalam 60 ml akuades sedikit demi sedikit sambil diaduk kuat-kuat, setelah didiamkan terjadi dua lapisan. Selanjutnya dipisahkan dalam corong pisah terjadi lapisan atas (A-1) dan lapisan bawah (B-1). Lapisan A-1 diekstrak dengan larutan NaOH baru (8 g NaOH dalam 80 ml akuades) disini terjadi dua lapisan kemudian dipisahkan dalam corong pisah, lapisan atas (A-2) dan lapisan bawah (B-2), lapisan B-1 diekstrak dengan petroleum eter 3x50 ml kemudian dipisahkan, lapisan atas A-3 dan lapisan bawah B-3. Lapisan B-2 dan B-3 digabung dan diasamkan dengan HCl 25% sambil diaduk (pH 3). Setelah didiamkan terjadi lapisan atas (A-4) dan lapisan bawah (B-4). Lapisan A-4 eugenol disimpan, sedangkan lapisan B-4 diekstrak dengan petroleum eter sebanyak 2x50 ml, terjadi lapisan atas (A-5) dan lapisan bawah (B-5) kemudian lapisan A-4 dan B-5 digabung dicuci dengan aquades sampai netral dan dikeringkan dengan natrium sulfat *anhydrous*. Selanjutnya disaring dan fasa cair diuapkan pelarutnya dengan evaporator, dan residunya ditimbang.

Selanjutnya untuk fraksinasi dilakukan sebanyak 75 g eugenol kasar dimasukkan ke dalam labu leher tiga yang berkapasitas 500 mL dan dihubungkan dengan seperangkat distilasi pengurangan tekanan. Tiap-tiap fraksi yang diperoleh ditampung dengan labu fraksi yang berukuran 50 mL pada variasi suhu 40, 60, 165-183 °C. Kandungan eugenol dalam fraksi-fraksi (F-1, F2, F3 dan F4) yang diperoleh diuji dengan spektrofotometer menggunakan eugenol murni sebagai standar dan identifikasi senyawanya dilakukan dengan IR dan GC-MS.

#### Efek Quencher Oksigen Singlet dari Eugenol

Efek quencher oksigen singlet diuji dengan metode Lee dkk. (1997) dengan sedikit dimodifikasi. Efek eugenol terhadap fotooksidasi menggunakan konsentrasi: 0, 500, 1000 dan 1500 ppm dalam asam linoleat (0,03 M) yang dipersiapkan dalam etanol dan mengandung 15 ppm eritrosin sebagai sensitiser. Sebagai kontrol positif digunakan vitamin E. Sampel dari campuran tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 30 mL (60 x 30 mm, kondisi botol sama) yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya 4.000 lux. Angka peroksida diukur selama 5 jam dengan metoda AOCS (1980). Dalam kondisi yang sama dilakukan juga kondisi tanpa cahaya dengan cara botol serum dibungkus dengan aluminium foil.

#### Penentuan Mekanisme dan Kinetika Quenching Oksigen Singlet

Mekanisme dan kinetika senyawa yang terisolasi dengan eritrosin sebagai sensitiser terhadap fotodegradasi eritrosin

dipelajari melalui pendekatan metode kinetika *steady state* dari Foote dkk. (1970), dengan menggunakan konsentrasi 0;  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  dan  $136,39 \times 10^{-4}$  mM. Sedangkan konsentrasi eugenol yang digunakan adalah 0;  $0,06 \times 10^{-4}$ ;  $0,12 \times 10^{-4}$ ;  $0,24 \times 10^{-4}$  dan  $0,48 \times 10^{-4}$  mM dalam air. Sampel dimasukkan dalam botol serum yang berukuran 30 mL ditutup rapat dengan penutup karet dan aluminium foil. Selanjutnya sampel ditempatkan dalam kotak cahaya 4000 lux. Fotodegradasi eritrosin dalam larutan berair dimonitor dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 525 nm dengan spektrofotometer Milton Roy 501. Konsentrasi eritrosin dihitung menggunakan kurva standar garis linear dalam perbedaan konsentrasi eritrosin dalam larutan berair selama 15 jam pencahayaan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Daun Cengkeh dengan Distilasi Uap

Dari empat kali distilasi uap daun cengkeh diperoleh rendemen berturut-turut adalah 4,05; 4,53; 3,40 dan 3,21%. Minyak cengkeh yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan, berbau pedas seperti minyak cengkeh dan berminyak. Dari data tersebut diketahui bahwa komponen terbanyak dalam minyak daun cengkeh adalah komponen nonpolar. Hasil analisis dengan spektrofotometer dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu, minyak daun cengkeh hasil distilasi uap menunjukkan kandungan eugenol rata-rata sebesar  $63,67 \pm 0,02\%$ . Edi Suryanto (1996) melaporkan bahwa kandungan eugenol dalam minyak daun cengkeh hasil redistilasi menggunakan metode kromatografi gas diperoleh sebesar 74,48%. Hasil penelitian lain menyatakan bahwa kandungan eugenol dalam minyak cengkeh dapat mencapai 70-90% (Ketaren, 1985).

### Isolasi Eugenol dari Minyak Daun Cengkeh

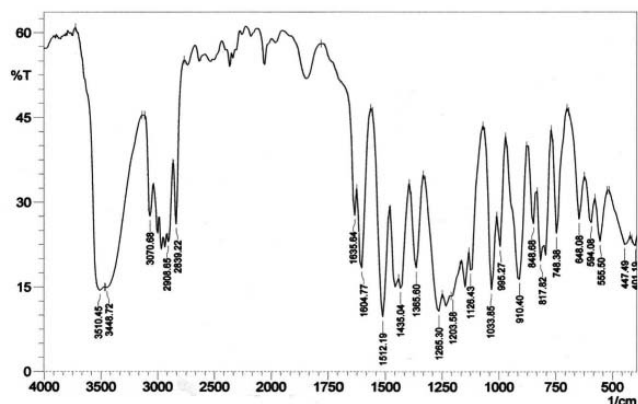
Dari dua kali isolasi eugenol menggunakan bahan dasar 50 g minyak daun cengkeh yang telah didistilasi diperoleh eugenol kasar sebanyak 39,02 g (78,04%) dan 39,89 g (79,78%) dengan tetapan fisiknya adalah cairan berwarna coklat kemerahan. Eugenol hasil isolasi masih kasar dan berwarna coklat kemerahan. Warna coklat kemerahan ini disebabkan adanya reaksi antara senyawa fenolik dalam minyak daun cengkeh dengan natrium hidroksida yang tersisa. Oleh karena itu perlu dilakukan pemurnian dengan cara distilasi fraksinasi pengurangan tekanan. Sebanyak 75 g eugenol kasar didistilasi fraksinasi diperoleh 4 fraksi, Hasil distilasi fraksinasi dapat dilihat pada Tabel 1. Secara keseluruhan diperoleh 63,76 g atau sekitar 80,01%, selanjutnya dilakukan serangkaian analisis distilat menggunakan infra merah (IR)

dan kromatografi gas-spektrometer massa (CG-MS) dengan maksud untuk mengetahui senyawa yang teridentifikasi dalam distilat.

Tabel 1. Hasil pemurnian eugenol kasar dengan cara distilasi fraksinasi pengurangan tekanan

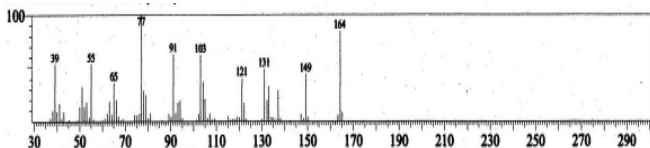
Fraksi	Suhu (°C)	Tekanan (mm Hg)	Berat (g)	Kandungan eugenol (%)
F1	< 40	520	3,68	49,68
F2	60	520	7,21	54,32
F3	165-183	520	37,66	87,16
F4	> 183	520	15,21	73,65

Dari pemeriksaan spektrometer IR pada fraksi III (F-3) pada Gambar 1 menunjukkan adanya pita lebar dan kuat pada 3448 cm<sup>-1</sup> adalah petunjuk untuk gugus OH. Sedangkan serapan daerah 3000-2800 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya gugus metilen -CH<sub>2</sub>- dan metil CH<sub>3</sub>. Pita antara 1600-1475 cm<sup>-1</sup> merupakan ikatan rangkap pada senyawa aromatis dan didukung pita tajam pada 1512 cm<sup>-1</sup>, pita-pita antara 3100-3000 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya alkena =CH- (sp<sup>2</sup>) sedangkan pita antara 1300-1100 cm<sup>-1</sup> merupakan khas gugus C-O dari eter.



Gambar 1. Spektrum IR eugenol hasil pemurnian dengan cara fraksinasi pengurangan tekanan pada fraksi III (F-3)

Untuk lebih memperkuat bukti dari F-3, maka perlu dianalisis dengan spektrometer GC-MS. Pemeriksaan dengan GC-MS membuktikan bahwa spektrum massa dengan ion molekular m/e = M = 164 (Gambar 2).

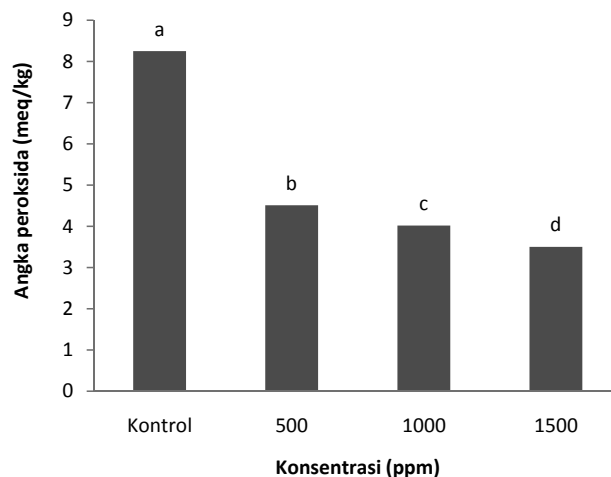


Gambar 2. Spektrum GC-MS eugenol dari hasil fraksinasi

Hasil fragmentasi tersebut adalah senyawa eugenol. Ini dapat dibuktikan spektrum massa dengan ion molekul m/e = M = 164. Lepasnya gugus CH<sub>3</sub> (M-15) menghasilkan pecahan dengan m/e = 149 yang distabilkan oleh resonansi dan diteruskan massa m/e = 121 dan diperoleh setelah lepasnya gugus CO (M-28).

**Efek Eugenol terhadap Fotooksidasi Asam linoleat**

Uji efektivitas eugenol pada fotooksidasi asam linoleat dilakukan dengan mengukur perubahan angka peroksida. Dari angka peroksida ini dapat diketahui tingkat kerusakan minyak. Perubahan angka peroksida dalam asam linoleat dengan perbedaan konsentrasi eugenol disajikan pada Gambar 3. Oksidasi asam linoleat pada periode waktu tertentu selama 5 jam pada suhu kamar dan diberikan cahaya fluoresen sebesar 4000 lux. Angka peroksida meningkat dalam asam linoleat yang diberikan cahaya fluoresen dan eritrosin sebagai sensitiser sebesar 8,25 meq/kg, sedangkan asam linoleat tanpa cahaya dan eritrosin adalah 2,02 meq/kg sama dengan angka peroksida awal (0 jam) sebesar 2,01 meq/kg. Data ini mengindikasikan bahwa tanpa cahaya dan sensitiser pembentukan oksigen singlet tidak dapat terjadi. Klorofil, mioglobin, riboflavin, eritrosin dan metilen biru telah dilaporkan keefektifannya sebagai sensitiser fotokimia untuk membentuk oksigen singlet (Whang, 1988; Yang dkk., 2002). Angka peroksida asam linoleat yang diberi 500, 1000 dan 1500 ppm eugenol setelah penyimpanan 5 jam berturut-turut adalah 4,51; 4,02 dan 3,50 meq/kg. Hal ini menunjukkan bahwa eugenol lebih efektif menurunkan angka peroksida daripada kontrol selama 5 jam pencahayaan fluoresen (4000 lux) pada suhu kamar.



Gambar 3. Efek berbagai konsentrasi eugenol terhadap fotooksidasi asam linoleat selama penyimpanan 5 jam dengan intensitas cahaya 4000 lux

Gambar 3 menunjukkan bahwa eugenol pada konsentrasi 500, 1000 dan 1500 ppm dapat menurunkan laju oksidasi oksigen singlet pada asam linoleat. Ketiga konsentrasi eugenol tersebut berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Eugenol pada konsentrasi yang lebih besar memiliki kemampuan yang lebih kuat menurunkan laju pembentukan hidroperoksida.

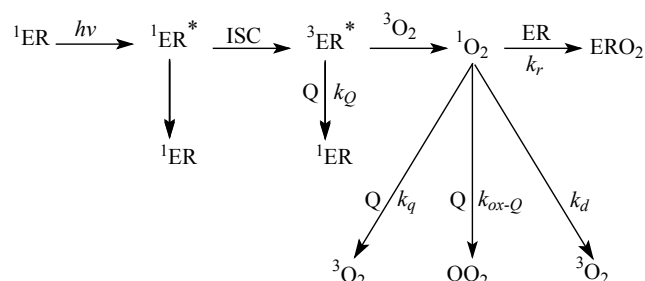
**Mekanisme dan Kinetika Quenching Oksigen Singlet oleh Eugenol**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tanpa penambahan eugenol, eritrosin terdegradasi sangat cepat dalam semua konsentrasi yang dicobakan. Mula-mula konsentrasi eritrosin  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  dan  $136,39 \times 10^{-4}$  mM dan setelah dilakukan pencahayaan konsentrasi eritrosin berturut-turut menjadi  $1,30 \times 10^{-3}$ ;  $2,60 \times 10^{-3}$ ;  $35,80 \times 10^{-3}$  dan  $104,90 \times 10^{-3}$  mM. Ini berarti bahwa eritrosin dalam cahaya fluoresen sangat mudah terdegradasi, tetapi laju degradasi eritrosin dapat dihambat dengan hadirnya quencher oksigen singlet dalam hal ini eugenol.

Eritrosin mampu berperan sebagai fotosensitizer dan reaktan dalam sistem degradasi fotosensitizer. Dalam sistem larutan berair, kelarutan oksigen lebih rendah daripada sistem pelarut non polar lain. Rendahnya persediaan oksigen lebih disukai reaksi fotosensitasi terhadap mekanisme tipe 1 (Huang dkk., 2004). Jika mula-mula konsentrasi eritrosin adalah tinggi. Tipe 1 lebih disukai sebab ini terbukti konsentrasi reaktan tertinggi untuk reaksi tipe 1. Dengan meningkatnya konsentrasi eugenol dalam larutan eritrosin, degradasi eritrosin menurun secara signifikan. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2, bila 0,48 mM eugenol dalam larutan eritrosin  $136,39 \times 10^{-4}$  mM, larutan eritrosin masih tersisa sebesar  $41,33 \times 10^{-2}$  mM selama 15 jam pencahayaan sedangkan tanpa eugenol eritrosin yang tersisa  $10,49 \times 10^{-2}$  mM. Ini jelas mengindikasikan bahwa eugenol mampu melindungi eritrosin dari degradasi selama penyimpanan di bawah cahaya fluoresen.

Dengan adanya efek eugenol terhadap penghambatan degradasi eritrosin pada beberapa konsentrasi yang disebabkan

oleh oksigen singlet, maka akan dilanjutkan dengan mempelajari mekanisme dan kinetika quenching oksigen singlet oleh eugenol dalam menurunkan laju degradasi eritrosin dengan pendekatan kinetika *steady-state* (Foote dkk., 1970). Diagram skematik untuk pembentukan hasil degradasi eritrosin ( $ERO_2$ ) dengan oksigen singlet adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Pembentukan dan reaksi oksigen singlet dengan substrat eritrosin (ER)

Bila suatu sensitizer seperti eritrosin (ER) bisa menyerap energi dari cahaya, ini menghasilkan suatu eritrosin singlet tereksitasi ( $^1ER^*$ ). Kemudian menjadi eritrosin triplet tereksitasi ( $^3ER^*$ ) melalui suatu mekanisme penyilangan antarsistem (*intersystem crossing, ISC*). Eritrosin triplet tereksitasi bisa bereaksi dengan quencher atau *quencher* (Q) menghasilkan suatu eritrosin pada keadaan dasar atau bisa bereaksi dengan oksigen triplet ( $^3O_2$ ) untuk menghasilkan oksigen singlet. Oksigen singlet mungkin secara alami terjadi dan bereaksi dengan eritrosin singlet untuk membentuk eritrosin teroksidasi ( $ERO_2$ ) atau dapat quencherkan secara fisik atau kimia melalui quencher (Min dan Boff, 2002). Dalam hal ini pembentukan produk teroksidasi ( $ERO_2$ ) dapat direduksi melalui quenching oksigen singlet atau sensitiser triplet tereksitasi (Lee dkk., 1997).

Persamaan kinetika *steady state* untuk quenching oksigen singlet dan eritrosin tereksitasi dalam hadirnya eritrosin untuk oksidasi oksigen singlet sebagai fotosensitizer

Tabel 2. Efek eugenol terhadap degradasi  $136,39 \times 10^{-4}$  mM eritrosin pada cahaya fluoresen

Eritrosin ( $\times 10^{-4}$ mM)	Eugenol (mM)	Penghambatan degradasi eritrosin (mM) selama penyimpanan (jam)									
		0	1	3	5	7	9	11	13	15	
136,39	0	1,4163	1,3050	0,9954	0,7868	0,5463	0,380	0,2341	0,1574	0,1049	
	0,06	1,4163	1,3012	1,0351	0,8841	0,6359	0,4798	0,3352	0,2329	0,1650	
	0,12	1,4125	1,2027	1,1105	0,9327	0,7139	0,6103	0,403	0,2955	0,2213	
	0,24	1,4112	1,2001	1,1208	1,0120	0,8086	0,6794	0,5297	0,4273	0,3416	
	0,48	1,4086	1,1860	1,1361	1,0466	0,8585	0,7408	0,5937	0,4926	0,4133	

dan sebagai reaktan adalah sebagai berikut (Foote *et al.*, 1970; Huang *et al.*, 2004):

$$\left\{ \frac{d[ERO_2]}{dt} \right\}^{-1} = K^{-1} \left\{ 1 + \frac{(k_q[Q])}{k_o[{}^3O_2]} \left( 1 + \frac{k_q + k_{ox-Q}[Q] + k_d}{k_r} x [ER]^{-1} \right) \right\}$$

dimana  $ERO_2$  adalah konsentrasi eritrosin teroksidasi;  $K$  adalah kuantum dari penyilangan antar sistem;  $k_o$  adalah tetapan reaksi untuk quenching eritrosin triplet;  $[Q]$  adalah konsentrasi quencher;  $k_o$  adalah tetapan reaksi untuk pembentukan dengan transfer energi dari eritrosin triplet tereksitasi menjadi oksigen triplet;  $[{}^3O_2]$  adalah konsentrasi oksigen triplet;  $k_q$  adalah konstanta laju reaksi quenching oksigen singlet fisik;  $k_{ox-Q}$  adalah konstanta laju reaksi quenching oksigen singlet kimia;  $k_d$  adalah laju reaksi berkurangnya oksigen singlet dalam pelarut;  $k_r$  adalah tetapan laju reaksi antara eritrosin dengan oksigen singlet dan  $[ER]$  adalah konsentrasi mula-mula dari eritrosin.

Dari persamaan tersebut dapat dibuat grafik hubungan  $[ERO_2]^{-1}$  dan  $[ER]^{-1}$  pada berbagai konsentrasi eugenol untuk menentukan persamaan regresi linier untuk masing-masing konsentrasi eugenol sehingga diperoleh slop dan intersepanya. Slop adalah  $K^{-1}$  dan intersepanya adalah  $K^{-1} \{ k_d + k_q[Q] + k_{ox-Q}[Q]/k_r \}$  sehingga diperoleh grafik hubungan  $[ERO_2]^{-1}$  dan  $[ER]^{-1}$ , slop dari persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik ini digunakan untuk menghitung tetapan laju quenching oksigen singlet oleh eugenol.

Jika dalam penelitian ini hanya quenching oksigen singlet yang terlibat, maka persamaan dapat disederhanakan sebagai berikut:

$$\left\{ \frac{d[ERO_2]}{dt} \right\}^{-1} = K^{-1} \left\{ 1 + \left( 1 + \frac{k_q + k_{ox-Q}[Q] + k_d}{k_r} x [ER]^{-1} \right) \right\}$$

Intersep dari persamaan tersebut tidak tergantung konsentrasi quenching (eugenol) dan slop tergantung pada konsentrasi quenching. Untuk menggambarkan  $[ERO_2]^{-1}$  dan  $[ER]^{-1}$  pada berbagai konsentrasi quencher akan menghasilkan intersep  $y$  yang sama dan slop yang berbeda. Intersep dari plot ini akan sama untuk  $K^{-1}$  dan slop akan menjadi sama dengan persamaan berikut:

$$K^{-1} \left( \frac{k_q + k_{ox-Q}[Q] + k_d}{k_r} \right)$$

Rasio slop pada intersep (S/I) akan menjadi persamaan berikut:

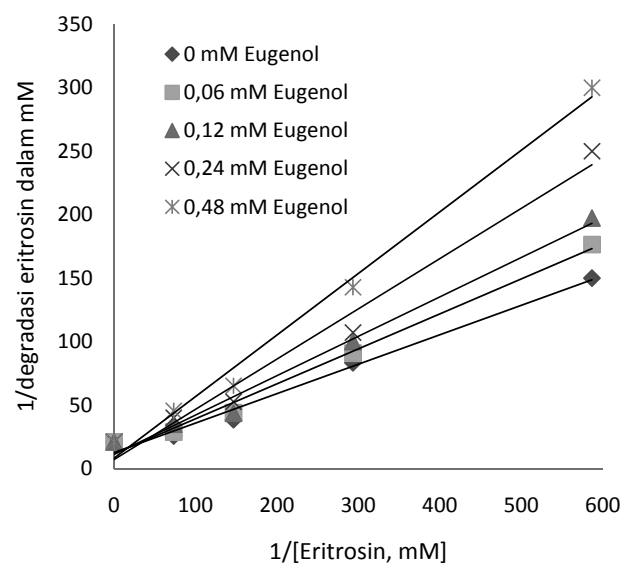
$$\frac{k_q + k_{ox-Q}[Q] + k_d}{k_r}$$

Persamaan ini tidak tergantung pada konsentrasi  $O_2$ . Suatu grafik baru S/I yang diplotkan lawan quencher (Q) akan menghasilkan dalam suatu garis dengan intersep  $k_d/k_r$  dan slop  $k_d + k_{ox-Q}/k_r$ . Jika menggunakan tanpa penambahan quencher dalam penelitian ini, maka persamaan selanjutnya disederhanakan menjadi berikut ini (Foote, 1979; Jung *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997).

$$\left\{ \frac{d[ERO_2]}{dt} \right\}^{-1} = K^{-1} \left( 1 + \frac{k_d}{k_r} x [ER]^{-1} \right)$$

Jika plot  $[ERO_2]$  dengan  $[ER]^{-1}$ , rasio slop pada intersep adalah  $k_d/k_r$ . Jika laju berkurang oksigen singlet  $k_d$  diketahui. Ini akan mungkin untuk menentukan tetapan laju reaksi  $k_r$  antara eritrosin dan oksigen singlet. Laju berkurangnya oksigen singlet ( $k_d$ ) dalam air telah dilaporkan adalah  $2,56 \times 10^5/s$  (Rodgers dan Snowden, 1982).

Hubungan timbal balik dari degradasi konsentrasi eritrosin lawan konsentrasi mula-mula eritrosin  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  dan  $136,39 \times 10^{-4}$  mM dalam air yang disimpan pada cahaya fluoresen selama 9 jam ditunjukkan pada gambar 14. Persamaan garis linier  $[ERO_2]^{-1}$  digambarkan lawan  $[ER]^{-1}$  adalah  $y = 0,082x + 2,155$  ( $R^2 = 0,995$ ), dimana  $x$  dan  $y$  adalah berbanding terbalik dari eritrosin mula-mula dan konsentrasi eritrosin teroksidasi berturut-turut adalah 0,0381; 0,0618; 0,0885; 0,1282 dan 0,3650. Intersep dari persamaan tersebut tidak tergantung konsentrasi quenching (eugenol) dan slope tergantung pada konsentrasi quenching. Untuk menggambarkan  $[ERO_2]^{-1}$  dan  $[ER]^{-1}$  untuk berbagai konsentrasi eugenol diperlihatkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Efek eugenol terhadap eritrosin dalam larutan berair dalam cahaya fluoresen selama penyimpanan 9 jam pada suhu kamar

Efek konsentrasi eugenol terhadap eritrosin yang dipelajari adalah 0 ; 0,06 x 10<sup>-4</sup> ; 0,12 x 10<sup>-4</sup> ; 0,24 x 10<sup>-4</sup> dan 0,48 x 10<sup>-4</sup> mM. Konsentrasi eritrosin adalah 17,05 x10<sup>-4</sup>; 34,10 x 10<sup>-4</sup>; 68,19 x 10<sup>-4</sup> dan 136,39 x 10<sup>-4</sup> mM dalam air pada suhu kamar selama 9 jam yang disinari cahaya fluorensen (4000 lux). Konsentrasi eritrosin menurun degradasinya dengan meningkatnya konsentrasi eugenol dari 0,06 x 10<sup>-4</sup> sampai 0,48 x 10<sup>-4</sup> mM. Dalam Gambar 5. di atas, intersep adalah sama untuk tingkat perbedaan konsentrasi eugenol, tetapi slope dari persamaan tersebut naik selama konsentrasi eugenol meningkat dari 0,06 x 10<sup>-4</sup> sampai 0,48 x 10<sup>-4</sup> mM. Ini menunjukkan bahwa eugenol hanya bertindak sebagai quenching oksigen singlet untuk menurunkan laju reaksi degradasi eritrosin. Dengan demikian eugenol dapat menurunkan fotodegradasi eritrosin melalui mekanisme quenching oksigen singlet, tetapi tidak menunjukkan mekanisme quenching sensitiser, dalam hal ini adalah eritrosin.

Tabel 3. Nilai slop dan intersep dari persamaan regresi linier Gambar 5

Quencher	Konsentrasi (10 <sup>-4</sup> mM)	Intersep (I)	Slop (S)	S/I (M)	R <sup>2</sup>
Eugenol	0	2,155	0,082	0,0381	0,995
	0,61	1,570	0,097	0,0619	0,998
	1,22	1,232	0,109	0,0885	0,992
	2,44	1,092	0,140	0,1282	0,985
	4,88	0,463	0,169	0,3650	0,995

Untuk menghitung konstanta laju reaksi quenching oksigen singlet oleh eugenol dengan eritrosin digunakan rasio slop/intersep dari persamaan garis regresi linier untuk menghubungkan [ERO<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> dan [ER]<sup>-1</sup> tanpa menggunakan eugenol sebagai quencher diperoleh persamaan garis regresi linear adalah y = 0,082x + 2,155 (R<sup>2</sup> = 0,995), dimana y = [ERO<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> dan x = [ER]<sup>-1</sup>. Rasio antara slope/intersep adalah 0,082/2,155 = 0,0381 mM. Selanjutnya untuk konsentrasi eugenol 0,61 x 10<sup>-4</sup> sampai 4,88 x 10<sup>-4</sup> M, rasio slop/intersep terlihat pada Tabel 3. Foote (1979) menyatakan bahwa rasio slope/intersep dari garis regresi untuk eritrosin tanpa adanya quencher (eugenol) adalah:

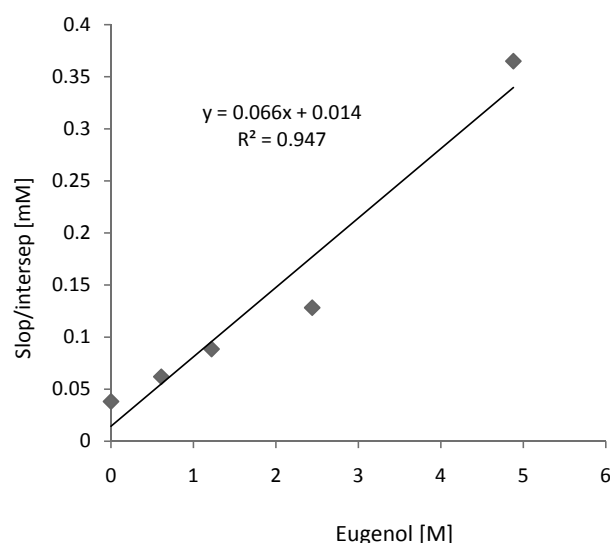
$$\text{Rasio(slop/intersep)} = \frac{k_d}{k_r}$$

Nilai k<sub>d</sub> dalam pelarut air adalah 2,56 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Rodgers dan Snowden, 1982). Oleh karena itu, laju oksidasi oksigen singlet (k<sub>r</sub>) dengan eritrosin adalah:

$$k_r = \frac{k_d}{\text{rasio(slop/intersep)}}$$

$$k_r = \frac{2,56 \times 10^5 \text{ s}^{-1}}{3,81 \times 10^{-2}} = 0,67 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (} 0,67 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{)}$$

Huang *et al.* (2004) melaporkan laju oksigen singlet untuk riboflavin sebagai sensitiser adalah 1,01 x 10 x 10<sup>10</sup> M/s dalam pelarut air. Data penghitungan rasio slop/intersep yang terdapat pada Tabel 3. digunakan untuk menghitung laju quenching oleh eugenol. Laju quenching (eugenol) terhadap oksigen singlet (k<sub>q</sub> + k<sub>ox-Q</sub>) digambarkan dengan hubungan slop/intersep dan konsentrasi eugenol, didapatkan persamaan garis adalah y = 0,066x + 0,014 dan koefisien korelasi (R<sup>2</sup>) 0,947 (Gambar 6).



Gambar 6. Hubungan antara slop/intersep dalam tabel 3 pada konsentrasi eugenol

Foote (1979) menyatakan bahwa hubungan slope dari rasio slope/intersep dengan konsentrasi eugenol [Q] adalah k<sub>q</sub> + k<sub>ox-Q</sub> / k<sub>r</sub> sehingga konstanta laju quenching oksigen singlet total oleh eugenol (k<sub>q</sub> + k<sub>ox-Q</sub>) adalah 0,67 x 10<sup>10</sup>/M/s x 0,066 = 4,42 x 10<sup>8</sup>/M/s. Konstanta laju yang diperoleh secara eksperimen tersebut mungkin dipengaruhi sejumlah faktor seperti suhu (Li dkk., 2001), pH (Mashiko dkk., 1991), kekuatan ion dalam sistem pelarut (Rubio dkk., 1992) dan rasio pelarut organik pelarut berair (Li dkk., 2001). Tipe sensitiser untuk menghasilkan oksigen singlet mungkin juga berpengaruh terhadap laju quenching oksigen singlet (Hall dan Chignell, 1987). Laju quenching oksigen singlet eugenol belum pernah ada data yang melaporkan sebelumnya. Sebagai pembanding adalah laju konstanta quencher dari natrium azida, NaN<sub>3</sub> (termasuk pentabil oksigen singlet) adalah 1,547 x 10<sup>7</sup>/M/s.

## KESIMPULAN

Daun cengkeh yang diekstraksi dengan cara distilasi uap mengandung senyawa eugenol. Distilat yang diperoleh dari hasil distilasi adalah 15,17 g atau 3,79%, sedangkan hasil isolasi eugenol dari minyak cengkeh diperoleh 78,91%. Eugenol kasar difraksinasi dengan distilasi pengurangan tekanan diperoleh empat fraksi. Hasil analisis fraksi tiga dengan infra merah (IR), <sup>1</sup>H NMR dan CG-MS menunjukkan adanya gugus hidroksi dari senyawa fenolik sedangkan pada <sup>1</sup>H NMR menunjukkan jumlah proton pada OH pada cincin aromatik dan spektrometer massa menunjukkan m/e = 164 sebagai puncak tertinggi yang teridentifikasi sebagai eugenol. Eugenol dapat menghambat fotooksidasi asam linoleat dalam hadirnya eritrosin sebagai sensitiser. Mekanisme quenching oksigen singlet terhadap fotodegradasi eritrosin oleh eugenol sebagai quenching oksigen singlet dan bukan quenching sensitiser. Konstanta laju quenching oksigen singlet total ( $k_q + k_{ox-Q}$ ) oleh eugenol adalah  $4,42 \times 10^8$  M/s.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi: Penelitian Fundamental Tahun 2010, Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOCS. (1980). *Official and Tentative Methods*. American Oil Chemists Society, Champaign, IL.
- Foote, C.S., Chang, Y.C. dan Denny, R.W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. X. carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Oil Chemists Society* **92**: 5216-5218.
- Guenther, E. (1950). (Terjemahan Ketaren, S., 1990). *Minyak Atsiri Jilid IVB*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Gulcin, I., Sat, I.G., Beydemir, S., Elmastas, M. dan Kufrevioglu, O.I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* **87**: 393-400.
- Huang., Choe, E. dan Min, D.B. (2004). Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *Journal of Food Science* **9**: C726-C732.
- Ito, M., Murakami, K. dan Yoshino, M. (2004). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* **43**: 461-466.
- Kollmannsberger, H. dan Nitz, S. (1994). Über die aromastoffzusammensetzung von hoch-drude-extracten: 3 gewürznelken (*Zyngium aromaticum*). *Chimica Mikrobiology Technology Lebensmittel* **16**: 112-123.
- Lee, K.H., Jung, M.Y. dan Kim, S.Y. (1997). Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* **74**: 1053-1057.
- Lee, K.W dan Shibamoto, T. (1997). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. Et Perry). *Journal of the American Oil Chemists Society*. **74**: 1053-1057.
- Li, M.Y., Cline C.S., Koker, E.B., Carmichael, H.H., Chignell, C.F. dan Bilski, P. (2001). Quenching of singlet molecular oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) by azide anion in solvent mixtures. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **74**: 760-764.
- Mashiko, S., Suzuki, N., Koga, S., Makano, M., Goto, T., Ashino, T., Mizumoto, I. dan Inaba, H. (1991). Measurement of rate constants for quenching singlet oxygen with a cypridina luciferin analog (2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one) and sodium azide. *Journal of Bioluminescence Chemilum* **6**: 69-72.
- Min, D.B. dan Boff, J.M. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Food Science and Food Safety* **1**: 58-72.
- Rao, M., Kumar, M.M. dan Rao, M.A. (1999). In vitro and in vivo effects of phenolics antioxidant against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **124**: 383-390.
- Rodgers, M.A. dan Snowden, P.T. (1982). Lifetime of singlet delta dioxygen in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *Journal of the American Chemical Society* **104**: 5541-5543.
- Rubio, M.A., Martire, D.O., Braslavsky, S.E. dan Lessi, L.A. (1992). Influence of the ionic strength on singlet oxygen (<sup>1</sup>D<sub>2</sub>) quenching by azide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **66**: 153-157.



Yang, W.T., Lee, J.H. dan Min, D.B. (2002). Quenching mechanisms and kinetics of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene on the photosensitizing effect of synthetic food colorant FD&C Red No. 3. *Journal of Food Science* **67**: 507-510.

Whang, K. dan Peng, I.C. (1988). Detection of singlet oxygen generation by chlorophyll using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of Food Science* **53**: 1918-1919.

Results generated by Plagiarisma.Net  
<http://plagiarisma.net>

Unique

[Phenolic Compound from Clove Leave \(\*Eugenia Caryiophyllata\* Thumb\) on Photooxidation](#)

About 3 results

[fenolik dalam daun cengkeh dan mempelajari mekanisme dan kinetika quenching](#)

[jurnal.ugm.ac.id](#) [jurnal.ugm.ac.id](#) [neliti.com](#)

About 2 results

[Daun cengkeh diekstraksi dengan cara destilasi uap menggunakan air](#)

[jurnal.ugm.ac.id](#) [jurnal.ugm.ac.id](#)

About 2 results

[Minyak daun cengkeh kasar selanjutnya dimurnikan dengan destilasi pengurangan](#)

[jurnal.ugm.ac.id](#) [jurnal.ugm.ac.id](#)

Unique

[\(IR\), resonansi magnetik inti \( \$^1\text{H}\$  NMR\), dan spektrometer](#)

About 2 results

[fotooksidasi asam linoleat \(0,03M\) yang mengandung 15 ppm eritrosin dalam](#)

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id) [jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

About 2 results

[Mekanisme dan kinetika quenching oleh eugenol dipelajari dengan metode](#)

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id) [jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

About 2 results

[0,24 x 10<sup>-4</sup> dan 0,48x 10<sup>-4</sup> mM](#)

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id) [jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

About 2 results

[mM eritrosin yang disinari oleh cahaya fl uoresen \(4000 lux\)](#)

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id) [jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

About 2 results

[Hasil analisis kandungan eugenol dari minyak cengkeh, F1, F2,](#)

[jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id) [jurnal.ugm.ac.id](http://jurnal.ugm.ac.id)

**Unique**

[proton pada cincin aromatik menjadi 3 atom H dan spektrometer](#)

AGRITECH, Vol. 32, No. 2, MEI 2012 117 MEKANISME DAN KINETIKA QUENCHING OKSIGEN SINGLET DARI SENYAWA FENOLIK DAUN CENGKEH TERHADAP FOTOKSIDASI YANG DISENSITASI OLEH ERITROSIN Mechanism and Kinetics of Singlet Oxygen Quenching of Phenolic Compound from Clove Leave (*Eugenia Caryiophyllata* Thumb) on Photooxidation Sensitized by Erythrosine Edi Suryanto, Johnly A.

Rorong, Dewa Gede Katja Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi, Kampus Unsrat, Bahu Manado 95115 Email: edisuryanto@yahoo.com ABSTRAK Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa fenolik dalam daun cengkeh dan mempelajari mekanisme dan kinetika quenching oksigen singlet. Daun cengkeh diekstraksi dengan cara destilasi uap menggunakan air selama 6 jam. Minyak daun cengkeh kasar selanjutnya dimurnikan dengan destilasi pengurangan tekanan. Fraksi-fraksi yang terisolasi ditentukan strukturnya dengan metoda infra merah (IR), resonansi magnetik inti ( $^1\text{H}$  NMR), dan spektrometer massa (MS). Efek 0, 500, 1000 dan 1500 ppm eugenol terhadap fotooksidasi asam linoleat (0,03M) yang mengandung 15 ppm eritrosin dalam etanol dipelajari dengan mengukur angka peroksida minyak. Mekanisme dan kinetika quenching oleh eugenol dipelajari dengan metode steady-state. Sampel 0;  $0,06 \times 10^{-4}$ ;  $0,12 \times 10^{-4}$ ;  $0,24 \times 10^{-4}$  dan  $0,48 \times 10^{-4}$  mM eugenol dipersiapkan dalam pelarut air yang juga mengandung 0;  $17,05 \times 10^{-4}$ ;  $34,10 \times 10^{-4}$ ;  $68,19 \times 10^{-4}$  dan  $136,39 \times 10^{-4}$  mM eritrosin yang disinari oleh cahaya fl uoresen (4000 lux) pada suhu kamar selama 15 jam. Hasil analisis kandungan eugenol dari minyak cengkeh, F1, F2, F3 dan F4 berturut-turut adalah 49,68; 54,32; 87,16 dan 73,65%. Kebenaran struktur F3 diidentifikasi kasi dengan spektrometer IR pada serapan kuat  $3448\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus hidroksil dari senyawa fenolik sedangkan pada  $^1\text{H}$  NMR menunjukkan jumlah proton pada cincin aromatik menjadi 3 atom H dan spektrometer massa menunjukkan  $m/e = 164$  sebagai puncak tertinggi dan

Total 33748 chars (2000 limit exceeded) , 302 words, 3 unique sentences, 28% originality