

Enzim Papain: Aspek *Green Chemistry* pada Reaksi Knoevenagel

Laurentius Haryanto¹, Antonius Herry Cahyana¹

¹Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok. 16424

Email : laurentius.haryanto@gmail.com

Abstrak

Aspek *green chemistry* merupakan pendekatan kimia yang banyak digunakan dalam dua dekade belakangan ini. Salah satu prinsipnya adalah pengembangan metode sintesis yang lebih “hijau”. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa papain terbukti dapat mengkatalisis reaksi *Knoevenagel* untuk 3 macam senyawa benzaldehida tersubstitusi dan *malononitrile* yang dilangsungkan dalam pelarut air. Kondisi terbaik, dengan rendemen sekitar 80%, diperoleh pada penggunaan papain sebanyak 25 mg/mmol substrat. Reaksi dilangsungkan pada suhu dan tekanan ruang selama 30 menit. Tiga produk yang diperoleh berbentuk kristal jarum berwarna kekuningan hingga kuning dan telah berhasil dikarakterisasi, melalui penentuan titik leleh, spektrum UV-Vis, IR, Massa, serta ¹³C dan ¹H-NMR, sebagai senyawa 2-(4-hydroxybenzylidene)-malononitrile); 2-(3-hydroxybenzylidene)-malononitrile); dan 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-malononitrile).

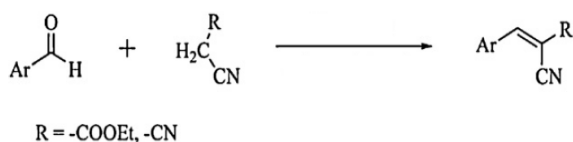
Abstract

Green chemistry aspect is the chemical approach that has been studied in the past two decade. One of the principles is the development of green synthesis process that is friendly for the environment. This research showed that papain can be used as catalyst for *Knoevenagel* reaction with 3 kinds of substituted-benzaldehyde and malononitrile as substrates in aqueous medium. The best reaction condition with 80% yield was reached by utilizing of 25 mg papain/mmol substrate. Reaction was conducted at ambient temperature and pressure for 30 min. Products were as yellowish to yellow needle crystals and successfully characterized by melting point, UV-Vis, IR, mass spectra, and ¹³C & ¹H-NMR, named as 2-(4-hydroxybenzylidene)-malononitrile); 2-(3-hydroxybenzylidene)-malononitrile); and 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-malononitrile).

Keywords: green chemistry, *knoevenagel* reaction, papain enzyme, antioxidant, sunscreen

PENDAHULUAN

Pada tahun 1998, Anatas sebagai perwakilan US EPA, bersama dengan Warner menerbitkan 12 prinsip dari *green chemistry*, yang dituliskan dalam sebuah buku (Anatas & Warner, 1998). Kedua belas prinsip tersebut terdiri dari instruksi-instruksi untuk para ahli kimia agar dapat melaksanakan proses-proses yang mendukung senyawa kimia yang baru, metode sintesis, serta teknologi proses yang baru (Wardencki *et al.*, 2005). Aspek *green chemistry* menjadi salah satu pendekatan yang banyak digunakan dalam bidang sintesis kimia organik, khususnya sintesis senyawa kimia yang dapat digunakan dalam berbagai macam industri. Hal ini terkait dengan penggunaan bahan baku, energi, serta desain proses yang lebih ramah terhadap lingkungan. Pendekatan ini menjadi salah satu aspek yang mendorong para peneliti kimia organik kembali mempelajari berbagai macam reaksi kimia, salah satunya adalah reaksi *Knoevenagel*. Reaksi *Knoevenagel* tergolong sebagai reaksi kondensasi, terjadi antara senyawa aldehida atau keton dengan senyawa metilen aktif, yang biasanya dikatalisis oleh basa, amonia atau amina lainnya, dalam pelarut organik.



Gambar 1. Skema reaksi *Knoevenagel*

Ricardo (2012) juga merangkum beberapa proses sintesis senyawa obat dengan reaksi

Knoevenagel yang dilangsungkan dengan pendekatan *green chemistry*. Pendekatan *green chemistry* telah mengambil peranan penting dalam berbagai pengembangan ilmu kimia maupun teknologi kimia, yang berkontribusi pada pengurangan tingkat pencemaran lingkungan (Linthorst, 2010). Pendekatan bioteknologi dalam reaksi *Knoevenagel* juga telah banyak diaplikasikan, terutama dalam hal pemanfaatan enzim sebagai katalis reaksi. Beberapa publikasi yang sudah ada terkait pemanfaatan enzim untuk katalis reaksi *Knoevenagel* antara lain: *alkaline protease* yang diperoleh dari *Bacillus licheniformis* (Wang *et al.*, 2011 dan Bang *et al.*, 2012); dan papain (Wen *et al.*, 2012); *proline-functionalised polyacrylonitrile fiber* (Gou *et al.*, 2013), lipase (Zhi *et al.*, 2014), serta enzim *Eschericia coli* BioH esterase (Jiang & Yu, 2014).

Reaksi *Knoevenagel* banyak diaplikasikan dalam hal pembuatan bahan baku obat, antara lain: warfarin, yang berfungsi sebagai anti-koagulan dalam darah (Xie *et al.*, 2012); atorvastatin, obat penurun kolesterol (Li *et al.*, 2004; Roth, 1993); pioglitazon, obat diabetes (Madivada *et al.*, 2009); dan pregabalin, obat epilepsi (Martinez *et al.*, 2008).

Papain (EC 3.4.22.2) merupakan enzim yang berhasil diisolasi dari getah buah pepaya (*Carica papaya* L.) dan tergolong ke dalam enzim *cysteine-protease* (Amri & Mamboya, 2012). Getah buah pepaya

merupakan sumber yang banyak mengandung enzim *cysteine endopeptidase*, termasuk papain, *glycyl endopeptidase*, *chymopapain*, dan *caricain*, yang secara keseluruhan hampir mencapai 80% penyusun dari keseluruhan fraksi enzim (Azarkan *et al.*, 2003). Sebagai enzim proteolitik, papain memegang peranan penting dalam berbagai proses biologis (Tsuge *et al.*, 1999).

Wen *et al.*, (2012) pertama kali mempublikasikan bahwa enzim papain dapat digunakan sebagai katalis untuk reaksi *Knoevenagel* antara senyawa aldehida; baik aromatik, hetero-aromatik, maupun α,β -tak jenuh-; dengan senyawa metilen aktif, seperti asetilaseton dan etil asetoasetat, dalam medium berupa campuran air dan dimethyl sulfoxide (DMSO). Berbagai enzim protease lainnya yang berbeda juga telah dicoba dalam penelitian tersebut dan menunjukkan bahwa enzim papain menghasilkan rendemen reaksi yang paling tinggi jika dibandingkan dengan enzim bromelain yang diperoleh dari buah nanas.

Penelitian yang dilakukan memiliki tujuan untuk mengetahui dan mempelajari kondisi terbaik untuk reaksi *Knoevenagel*, antara senyawa benzaldehida tersubstitusi (berupa 4-hidroksi-benzaldehida; 3-hidroksi-benzaldehida; dan 4-hidroksi-3-metoksi-benzaldehida atau vanilin) dengan *malononitrile*, yang dikatalisis oleh papain dalam pelarut air serta melakukan karakterisasi produk hasil reaksi *Knoevenagel*. Penelitian ini

diharapkan memberikan manfaat bagi kemajuan perkembangan metode sintesis yang berbasis *green chemistry* dengan memanfaatkan bahan terbarukan dan pelarut yang ramah lingkungan.

METODE

Penelitian ini secara umum terdiri dari 3 tahapan utama, yaitu sintesis senyawa kimia produk reaksi *Knoevenagel*, karakterisasi produk reaksi, serta pengujian aktivitas produk reaksi. Bahan-bahan yang digunakan antara lain enzim papain, *4-hydroxybenzaldehyde*, *3-hydroxybenzaldehyde*, vanilin, *malononitrile* (Sigma-Aldrich), serta TLC *silica gel 60 F₂₅₄*, heksana, etil asetat, etanol absolut, methanol, asetonitril (Merck). Seluruh bahan langsung digunakan dan tidak dilakukan pemurnian terlebih dahulu.

Sintesis reaksi *Knoevenagel*

Reaksi *Knoevenagel* dilakukan dengan mengikuti prosedur berikut: ke dalam labu reaksi yang mengandung masing-masing 2 mmol substrat dimasukkan sejumlah enzim papain dengan variasi jumlah mulai dari 15 mg (p15), 30 mg (p30), 50 mg (p50), dan 60 mg (p60), kemudian ditambahkan 20 mL air sebagai pelarut, campuran divortex agar merata. Reaksi dilangsungkan pada kondisi suhu kamar. Setelah 30 menit, reaksi kemudian dihentikan, campuran dipindahkan ke dalam tabung sentrifugal berukuran 50 mL, sisa dalam labu reaksi dibilas menggunakan 10 mL air. Endapan yang diperoleh dipisahkan

menggunakan sentrifuga dengan kecepatan 5000 x g, pada suhu 20°C selama 15 menit. Larutan supernatan dipisahkan kedalam tabung lainnya, kemudian ditambahkan etil asetat sebanyak 10 mL lalu ekstraksi cair-cair dilakukan. Fraksi organik kemudian dipisahkan dan sisa fraksi air diekstraksi kembali menggunakan etil asetat. Fraksi organik disatukan dan diuapkan dengan menggunakan *rotavapor*, kemudian digabungkan dengan endapan, selanjutnya disebut sebagai produk reaksi. Produk reaksi direkristalisasi menggunakan metanol hangat.

Pengaruh jumlah papain yang digunakan sebagai katalis untuk reaksi *Knoevenagel* diamati dengan analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) – Densitometri menggunakan satu set alat kromatografi CAMAG. KLT dilakukan menggunakan plat aluminium yang dilapisi *silica gel* 60 F₂₅₄ dengan fasa gerak berupa campuran heksana dan etil asetat dengan perbandingan volume 2:1. Elusi dilakukan sejauh 8 cm dan hasil KLT diamati di bawah sinar UV-366 nm. Pengolahan data, baik penentuan nilai Rf serta serapan UV-Vis dan area puncak pada analisis densitometri dilakukan dengan bantuan *software* WinCATS. Pengaruh suhu dan waktu reaksi dipelajari dengan menggunakan 2 mmol substrat 3-hidroksi-benzaldehida yang direaksikan dengan *malononitrile*, dengan menggunakan enzim papain, sesuai hasil optimasi, dan 20 mL air sebagai pelarut. Percobaan variasi waktu reaksi dilakukan pada reaksi dengan suhu kamar, mulai dari 15, 30, 45, dan 60 menit. Percobaan pengaruh suhu reaksi dilakukan dengan memvariasikan suhu mulai dari suhu

Pharm Sci Res

kamar, 40, 50, 60, dan 70°C. Pengaruh waktu dan suhu pada reaksi *Knoevenagel* yang dikatalisis oleh papain juga diamati dengan analisis KLT-Densitometri.

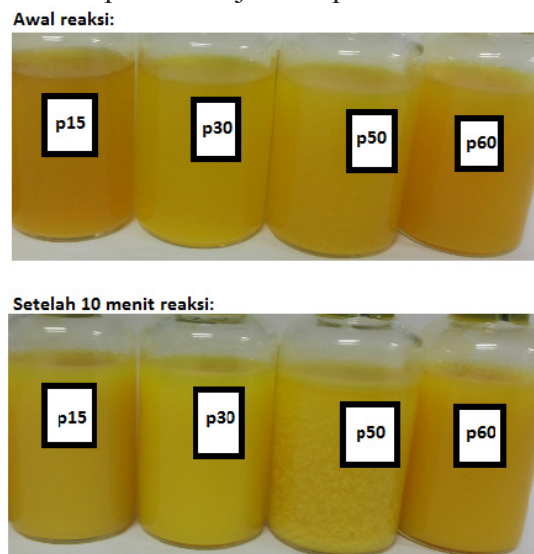
Karakterisasi produk reaksi

Produk reaksi dikarakterisasi mulai dari bentuk dan warna kristal, titik leleh (Electrothermal IA 9000), serapan UV-Vis (Agilent Cary 60 *UV-Vis Spectrophotometer*), serapan inframerah (Jasco FT-IR 6100), spektrum massa diperoleh dari analisis menggunakan Waters HPLC-PDA-MS *TOF LCT Premier XE*, serta konfirmasi struktur molekul menggunakan JEOL NMR ¹³C-NMR 125 MHz dan ¹H-NMR 500 MHz.

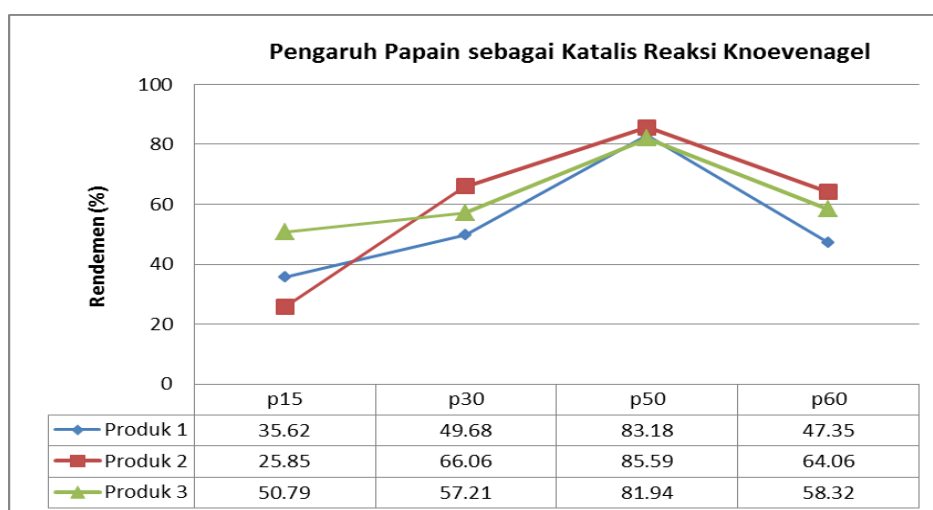
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh papain sebagai katalis reaksi

Reaksi *Knoevenagel* dengan katalis berupa papain berlangsung dengan ditandai adanya endapan yang mulai terbentuk pada menit ke-10 seperti ditunjukkan pada Gambar 2.



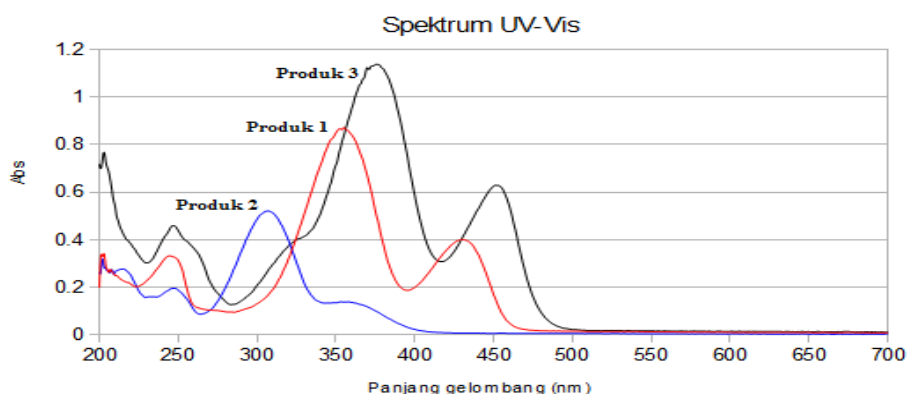
Gambar 2. Reaksi *Knoevenagel* dengan katalis berupa papain



Gambar 3. Rendemen masing-masing produk

Produk reaksi berada di fase endapan (padat) dan juga masih berada di fasa cair yang kemudian diperoleh dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat. Berdasarkan bobot yang diperoleh, produk sebagian besar didapatkan dari fasa endapan pada campuran setelah reaksi. Untuk ketiga macam substrat benzaldehida yang direaksikan dengan *malononitrile*, diperoleh kondisi optimum yang sama untuk jumlah papain yang digunakan sebagai katalis, yaitu pada jumlah 50 mg papain (p50).

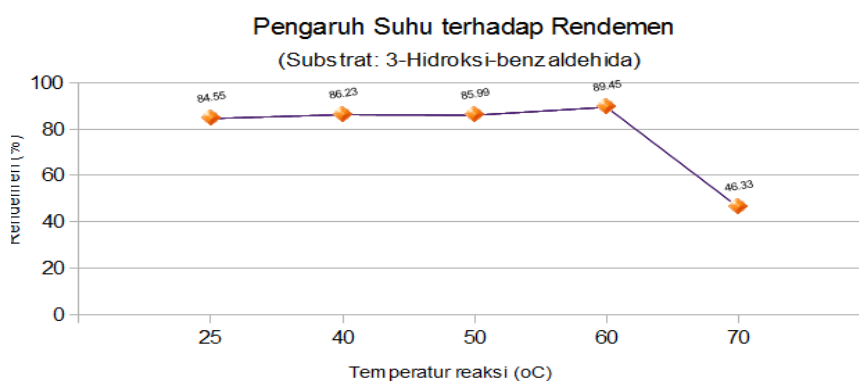
Profil serapan UV-Vis pada masing-masing produk dianalisis menggunakan KLT-densitometri dengan dibandingkan langsung terhadap substratnya. Berdasarkan serapan UV-Vis yang diperoleh, seperti ditampilkan pada Gambar 4, ketiga produk memiliki serapan maksimum secara berturut-turut pada 343 nm (1), 307 nm (2), 365 nm (3). Jika dibandingkan dengan masing-masing substratnya, produk mengalami pergeseran serapan maksimum ke arah panjang gelombang yang lebih besar, yaitu dengan pergeseran sekitar 50 nm. Pergeseran



Gambar 4. Serapan UV-Vis pada masing-masing produk hasil reaksi Knoevenagel

ini disebut sebagai pergeseran batokromik (*bathochromic shift*) atau dikenal juga sebagai pergeseran merah. Pergeseran ini terjadi karena adanya perpanjangan konjugasi atau delokalisasi elektron π dari struktur senyawa produk hasil reaksi (Supratman, 2010). Pergeseran serapan maksimum, sejauh 50 nm, pada ketiga produk menunjukkan

bahwa substrat telah bereaksi membentuk produk yang memiliki tambahan gugus yang memungkinkan perpanjangan konjugasi atau delokalisasi elektron π . Hal ini merupakan salah satu penanda bahwa papain dapat mengkatalisis reaksi antara substrat dengan *malononitrile* sehingga membentuk produk.



Gambar 5. Pengaruh suhu pada rendemen produk.

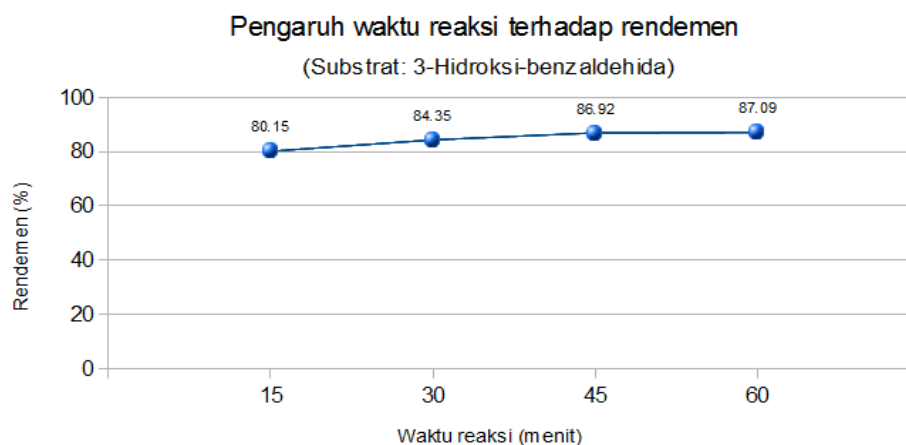
Pengaruh suhu reaksi

Pengaruh suhu reaksi pada reaksi *Knoevenagel*, yang dikatalisis oleh papain, diamati dengan substrat 3-hidroksi-benzaldehida. Reaksi dilakukan dengan menggunakan 2 mmol substrat dan 50 mg papain, sebagai hasil dari percobaan sebelumnya.

Berdasarkan rendemen yang diperoleh pada reaksi dengan variasi suhu, perubahan suhu hingga 50°C tidak menunjukkan adanya kenaikan rendemen yang signifikan, termasuk juga pada suhu 60°C, yang menunjukkan adanya sedikit kenaikan (sekitar 5%). Parameter suhu reaksi dapat dikaitkan dengan salah satu prinsip *green chemistry*, yaitu efisiensi energi. Wardencki *et al*, (2005) menyebutkan bahwa energi yang digunakan

dalam proses kimia harus seminimal mungkin dan dipertimbangkan dampaknya terhadap aspek lingkungan dan ekonomi. Jika memungkinkan, metode sintesis dilakukan pada suhu dan tekanan ruang. Oleh karena itu, kondisi reaksi *Knoevenagel* yang dikatalisis oleh papain pada suhu kamar (*ambient temperature*) lebih disukai dan dinilai lebih baik dari sisi efisiensi energi, dibandingkan dengan kondisi pada suhu reaksi 60°C.

Selain itu, suhu reaksi memegang peranan penting dalam sebuah reaksi yang dikatalisis oleh enzim karena dapat mempengaruhi kestabilan enzim serta laju reaksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kenaikan suhu, dari suhu kamar hingga 60°C, menghasilkan peningkatan rendemen hingga mencapai 89%, sedangkan jika suhu dinaikkan



Gambar 6. Pengaruh Waktu Reaksi Terhadap Rendemen

lagi maka rendemennya menurun secara tajam. Penurunan rendemen pada suhu 70°C pernah dilaporkan oleh Wen *et al.* (2012) yang juga menggunakan papain sebagai katalis reaksi *Knoevenagel*. Suhu tinggi, di atas 60°C, memberikan kemungkinan terjadinya denaturasi protein sehingga menyebabkan penurunan kinerja papain dan berujung pada penurunan rendemen. Pengaruh suhu reaksi juga berdampak distribusi asam amino pada permukaan protein papain, yang berdampak pada perilaku katalitik papain (Wen *et al.*, 2012).

Pengaruh waktu reaksi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa reaksi *Knoevenagel* yang dikatalisis oleh papain dapat dilangsungkan pada selang waktu 15-60 menit dengan rendemen yang relatif sama, seperti ditunjukkan pada Gambar 6. Reaksi selama 30 menit dinilai sudah cukup memenuhi prinsip *green chemistry*, terkait dengan efisiensi energi, dengan tingkat rendemen yang baik.

Karakterisasi produk

Hasil reaksi *Knoevenagel* berhasil direkristalisasi menggunakan metanol hangat. Kristal yang diperoleh berbentuk seperti jarum dengan warna kekuningan hingga kuning. Masing-masing kristal berhasil dikarakterisasi dan menunjukkan bahwa ketiga produk merupakan hasil reaksi *Knoevenagel* seperti yang pernah dipublikasikan oleh Deb & Bhuyan (2005), Hosseini-Sarvari *et al.* (2007), Constantin *et al.* (2012), Bhuiyan *et al.* (2012), dan Pal (2014).

Produk 1 berhasil dikarakterisasi sebagai *2-(4-hydroxybenzylidene)-malononitrile*. Kristal berbentuk jarum berwarna kekuningan. Nilai m/z (TOF MS, ES⁻): 168,98 (C₁₀H₆N₂O). Rendemen: 83%, titik leleh berkisar 184,6-186,1 °C; serapan UV-Vis (λ_{\max}): 355 nm; serapan IR (FT-IR, IR, ATR) ν_{\max} (cm⁻¹): 3345 (OH), 2235 dan 2226 (C≡N), 1610 (C=C), 1518 (C=C, Ph). ¹H-NMR (500 MHz, Aseton-d₆), δ_{H} (ppm):

8,10 (*s*, 1H, =CH); 7,98 (*d*, 2H, $J=8,5$ Hz); 7,06 (*d*, 2H, $J=9,1$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Aseton-d₆), δ_{C} (ppm): 164,46 (C-OH, Ph); 160,69 (=CH); 134,7; 124,56 (C-CH=, Ph); 117,5; 115,6 (C \equiv N); 114,74 (C \equiv N); 77,70 (=C(C \equiv N)₂).

Produk 2 dikarakterisasi sebagai senyawa **2-(3-hydroxybenzylidene)-malononitrile**.

Kristal berbentuk jarum berwarna kekuningan. Nilai m/z (TOF MS, ES⁻): 168,99 (C₁₀H₆N₂O). Rendemen: 86%, titik leleh berkisar 163,5-164,1 °C; serapan UV-Vis (λ_{max}): 307 nm; serapan IR (FT-IR, ATR) ν_{max} (cm⁻¹): 3363 (OH), 2241 dan 2224 (C \equiv N), 1615 (C=C). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aseton-d₆), δ_{H} (ppm): 9,15 (*s*, 1H, OH); 8,25 (*s*, 1H, =CH); 7,54 (*s*, 1H); 7,47 ppm (*dd*, 2H, $J=3,9$ Hz); 7,18 ppm (*m*, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Aseton-d₆), δ_{C} (ppm): 161,70 (=CH); 158,92 (C-OH, Ph); 133,67; 131,62; 123,77; 122,69; 116,89; 114,92 (C \equiv N); 113,87 (C \equiv N); 82,89 (=C(C \equiv N)₂).

Produk 3 adalah **2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-malononitrile**. Kristal berbentuk jarum berwarna kuning.

Nilai m/z (TOF MS, ES⁻): 199,00 (C₁₁H₈N₂O₂). Rendemen: 82%, titik leleh berkisar 134,0-134,2 °C; serapan UV-Vis (λ_{max}): 377 nm; serapan IR (FT-IR, ATR) ν_{max} (cm⁻¹): 3413 (OH), 2227 dan 2216 (C \equiv N), 1611 (C=C), 1509 (C=C, Ph). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aseton-d₆), δ_{H} (ppm): 8,10 (*s*, 1H, =CH); 7,76 (*d*, 1H, $J=2,0$ Hz); 7,58 (*dd*, 1H, $J=2,0$ dan 8,2 Hz); 7,05 (*d*, 1H, $J=8,4$ Hz); 3,91 (*s*, 3H, -CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Aseton-d₆),

δ_{C} (ppm): 160,91 (=CH); 154,31 (C-OCH₃); 148,85 (C-OH, Ph); 128,80; 124,79; 116,83; 115,62 (C \equiv N); 114,94 (C \equiv N); 113,38; 77,50 (=C(C \equiv N)₂); 50,33 (-CH₃).

KESIMPULAN

Pendekatan *green chemistry* pada reaksi *Knoevenagel* terbukti berhasil dilakukan dengan memanfaatkan enzim papain sebagai katalis reaksi dalam pelarut air. Produk yang dihasilkan lebih banyak ditemukan sebagai padatan yang mengendap dalam campuran reaksi. Rendemen terbesar dan optimal ditemukan pada penggunaan papain sebanyak 50 mg untuk 2 mmol substrat dalam 20 mL pelarut air pada suhu kamar dalam waktu 30 menit. Rendemen yang berhasil diperoleh dengan kondisi tersebut adalah sekitar 83% b/v (produk **2-(4-hydroxybenzylidene)-malononitrile**); 86% b/v (untuk produk **2-(3-hydroxybenzylidene)-malononitrile**); dan 82% b/v (**2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-malononitrile**).

DAFTAR ACUAN

- Amri, E., & Mamboya, F. (2012). Papain, a aplant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104
- Anatas, P. T., & Warner, J. C. (1998). *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford: Oxford University Press
- Azarkan, M., Moussasaoni, A. E., van Wuytswinkel, D., Dehon, G., & Looze, Y.

- (2003). Fractionation and purification of the enzyme stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B*, 790, 229-238
- Bang, H. X., Zhi, G., & Yan, H. H. (2012). Biocatalytic Knoevenagel reaction using alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30(2), 238-244
- Bhuiyan, M. M. H., Hossain, M. I., Alam, A., & Mahmud, M. M. (2012) Microwave assisted Knoevenagel condensation: synthesis and antimicrobial activities of some arylidene-malononitrile. *Chemistry Journal*, 2(1), 31-37
- Constantin, M-A., Conrad, J., & Beifuss, U. (2012). Laccase-catalyzed oxidative phenolic coupling of vanillidene derivatives. *Green Chemistry*, 14, 2375-2379
- Deb, M. L. & Bhuyan, P. J. (2005). Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature. *Tetrahedron Letters*, 46, 6453-6456
- Gou, W. L., Jia, X., & Wen, Q. Z. (2013). Highly efficient Knoevenagel condensation reactions by a proline-functionalized polyacrylonitrile fiber. *Chinese Chemical Letters*, 24, 52-54
- Hosseini-Sarvari, M., Sharghi, H., & Etemad, S. (2007). Solvent free Knoevenagel condensations over TiO₂. *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 1563-1567
- Jiang, L., Yu, H. (2014). Enzymatic promiscuity: *Escherichia coli* BioH esterase-catalysed Aldol reaction and Knoevenagel reaction. *Chemical Research in Chinese Universities*, 30 (2), 289-292
- Li, J. J., Johnson, D. S., Sliskovic, D. R., & Roth, B. D. (2004). Contemporary drug synthesis, Wiley-Interscience. New Jersey, USA
- Linthorst, J. A. (2010). An Overview: Origins and development of green chemistry. *Foundations of Chemistry*, 12, 55-68
- Madivada, L. R., Anumala, R. R, Gilla, G., Alla, S., Charagondla, K., *et al.* (2009). An improved process for pioglitazone and Its pharmaceutically acceptable salt. *Organic Process Research & Development*, 13(6), 1190-1194
- Martinez, C. A., Hu, S., Dumond, Y., Tao, J., Kelleher, P. & Tully, L. (2008). Development of a chemoenzymatic manufacturing process for pregabalin. *Organic Process Research & Development*, 12(3), 392-398
- Pal, R. (2014). Visible light induced Knoevenagel condensation: a clean and efficient protocol using aqueous fruit extract of *Tamarindus indica* as catalyst. *International Journal of Advanced Chemistry*, 2(1), 27-33
- Ricardo, M. (2012). Green Chemistry – Aspects for the Knoevenagel reaction, green chemistry – environmentally benign approaches, Dr. Mazaahir Kidwai (Ed.), ISBN: 978-953-51-0334-9, InTech
- Roth, B. D. (1993). [R-(R*R*)]-2-(4-fluorophenyl)-beta, delta -dihydroxy-5-(1-methylethyl-3-phenyl-4

- [(phenylamino) carbonyl]-1H-pyrrole-1-heptanoic acid, its lactone form and salts thereof. United States Patent, 1993, Patent No: 5273995
- Supratman, U. (2010). *Elusidasi struktur senyawa organik – metode spektroskopi untuk penentuan struktur senyawa organik*. Widya Padjajaran. ISBN: 978-602-8323-50-5
- Tsuge, H., Nishimura, T., Tada, Y., Asao, T., & Turk, D. (1999). Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain CLIK148 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 411-416
- Wang, C., Guan, Z., & He, Y. (2011). Biocatalytic domino reaction: synthesis of 2H-1-benzopyran-2-one derivatives using alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Green chemistry*, 13(8), 2048-2054
- Wardencki, W., Curylo, J., & Namiesnik, J. (2005). Green chemistry – current and future issues. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(4), 389-395
- Wen, H., Zhi G., Xiang, D., & Yan, H.H. (2012). Enzyme catalytic promiscuity: the papain-catalyzed Knoevenagel reaction. *Biochimie*, 94, 656-661
- Xie, B. H., Guan, Z., & He, Y. H. (2012). Promiscuous enzyme-catalyzed Michael addition: synthesis of warfarin and derivatives. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 1709-1714
- Zhi, W., Chun, Y. W., Hao R. W., Hong, Z., Ya, L. S., *et al.* (2014). Lipase-catalyzed Knoevenagel condensation between α,β -unsaturated aldehydes and active methylene compounds. *Chinese Chemical Letters*, 25, 802-804