

Pengaruh Variasi Jenis Asam terhadap Karakter Nanosilika yang Disintesis dari Abu Sekam Padi

Dini Hayati^a, Pardoyo^{a,*}, Choiril Azmiyawati^a

^a Inorganic Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275, Telepon (024) 7474754

* Corresponding author: pardoyoku@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

husk rice ash, sol-gel, nanosilica

Kata kunci:

Abu sekam padi, sol-gel, nanosilika

Abstract

Rice husk ash contains 80% silica therefore it can be utilized as raw material in synthesis of nanosilica. In this research, the synthesis of nanosilica from rice husk ash with variation of acid type which were HCl, H₂SO₄, and H₃PO₄ with each concentration 3M has been conducted. Nanosilicas were achieved by reacting sodium silicate which was obtained by dissolving rice husk ash in 2.5 M NaOH solution with acid catalyst to pH 7 via sol gel process. Based on the results, it was obtained that nanosilica produced by phosphate acid catalyst had a surface morphology size of 40 to 60 nm. Nanosilica produced by sulfuric acid catalyst (H₂SO₄) had the largest total surface area of 158.168 m² and pore volume among the three acid variations compared to hydrochloric acid (HCl) and phosphate (H₃PO₄) catalysts.

Abstrak

Abu sekam padi mengandung 80% silika sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam sintesis nanosilika. Pada penelitian ini dilakukan sintesis nanosilika dari abu sekam padi dengan variasi jenis asam yaitu HCl, H₂SO₄, dan H₃PO₄ dengan konsentrasi masing-masing 3M. Nanosilika diperoleh dengan mereaksikan natrium silikat yang diperoleh dengan melarutkan abu sekam padi dalam larutan NaOH 2,5 M kemudian proses sol gel dengan katalis asam hingga pH 7. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nanosilika dengan katalis asam fosfat dan diperoleh ukuran morfologi permukaan 40 sampai 60 nm. Nanosilika yang dihasilkan dengan katalis asam sulfat (H₂SO₄) menghasilkan luas permukaan dan volume total pori paling besar diantara ketiga variasi asam yang digunakan katalis asam klorida (HCl) dan asam fosfat (H₃PO₄), yaitu luas permukaan 158,168 m²/g, volume total pori 0,2378 cc/g, dan diameter pori rata-rata 6 nm.

1. Pendahuluan

Sekam padi terdiri dari 40% selulosa, 30% lignin, dan 20% silika [1] sedangkan pada abu sekam padi mengandung 80% silika sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam sintesis nanosilika.

Dengan perkembangan teknologi, aplikasi penggunaan silika pada industri semakin meningkat. Terutama penggunaan silika dalam ukuran kecil sampai skala nano partikel, banyak dimanfaatkan sebagai

material *building*, yaitu sebagai bahan campuran pada beton. Rongga yang kosong di antara partikel semen akan diisi oleh nanosilika sehingga berfungsi sebagai bahan penguat beton dan meningkatkan daya tahannya.

Beberapa peneliti menggunakan asam yang berbeda dalam sintesis nanosilika. Noushad, *dkk.* [2] menggunakan asam organik untuk presipitasi larutan natrium silikat, sementara Liou dan Yang [3] menggunakan asam klorida, asam sulfat, asam sitrat, dan asam oksalat. Penggunaan asam yang berbeda

dalam sintesis nanosilika mempengaruhi luas permukaan dan porositas nanosilika.

Pada penelitian ini, akan dilakukan sintesis nanosilika dari abu sekam padi dengan variasi asam yaitu asam klorida, asam sulfat, dan asam posfat masing-masing-konsentrasi 3 M dengan metode sol-gel pada kondisi pH 7.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi air destilasi, asam klorida (HCl) 37%, asam sulfat (H₂SO₄) 96%, asam posfat (H₃PO₄) 85%, natrium hidroksida (NaOH), dan etanol pro analis. Alat-alat yang digunakan meliputi peralatan gelas, magnetic stirrer, oven, furnace, neraca digital. Nanosilika hasil sintesis dikarakterisasi dengan instrument fourier transform infrared spectrometer (FTIR), gas sorption analyzer (GSA), dan scanning electron microscope-energy dispersive X-ray (SEM-EDX).

Ekstraksi silika

Sekam padi direndam dalam air destilasi selama satu malam dan dicuci dengan air destilasi untuk menghilangkan debu dan tanah. Sekam padi dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C selama 2 jam. Sekam padi hasil pengeringan dipanaskan dalam larutan HCl 1 M (dalam wadah air) pada suhu 75°C selama 1 jam untuk menghilangkan pengotor ion logam. Suspensi disaring dan residu padatnya dicuci dengan air destilasi hingga netral. Selanjutnya dilakukan pengarangan sekam padi. Arang sekam padi difurnace pada suhu 700°C selama 4 jam dengan laju kenaikan suhu 5°/menit untuk memperoleh abu sekam padi. Sepuluh gram abu sekam padi dilarutkan dalam 200 mL larutan natrium hidroksida (NaOH) 2,5 M dan dipanaskan dalam wadah teflon selama 2 jam pada suhu 100°C dan dihasilkan larutan natrium silikat.

Sintesis Nanosilika dengan Variasi Asam

Nanosilika dihasilkan dengan metode sol gel menggunakan variasi asam (HCl, H₂SO₄, dan H₃PO₄) dengan konsentrasi sama yaitu 3 M. Larutan natrium silikat dimasukkan dalam gelas beaker dan diaduk dengan magnetic stirrer. Larutan natrium silikat ditambahkan etanol pro analis dengan perbandingan 1:0,25 dan didiamkan selama 10 menit dengan pengadukan konstan, selanjutnya ke dalam larutan natrium silikat+etanol, larutan asam 3 M ditambahkan tetes demi tetes hingga pH 7 yang diamati dengan kertas pH universal dan diaduk dengan magnetic stirrer hingga terbentuk gel. Gel yang terbentuk didiamkan selama 2 hari, selanjutnya dioven pada suhu 80°C hingga terbentuk xerogel. Xerogel yang terbentuk dicuci dengan air deionisasi mendidih hingga netral untuk menghilangkan garam natrium yang terbentuk selama proses sol gel. Serbuk silika yang diperoleh digerus dengan mortal dan dikeringkan pada suhu 80°C hingga kering. Selanjutnya, difurnace pada suhu 550°C untuk menghilangkan senyawa organik.

3. Hasil dan Pembahasan

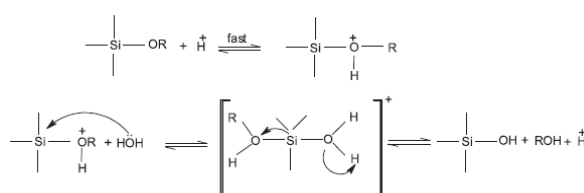
Sintesis nanosilika

Nanosilika disintesis dengan metode sol-gel menggunakan precursor SiO₂ yang diekstraksi dari abu sekam padi dengan melarutkan abu sekam padi ke dalam larutan NaOH 2,5 M menghasilkan larutan natrium silikat berwarna bening.

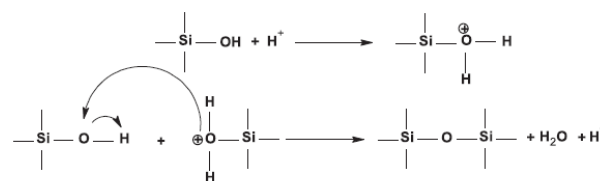


Gambar 1. Mekanisme reaksi pembentukan natrium silikat [4].

Metode sol-gel meliputi tahapan proses hidrolisis dan kondensasi sebagai berikut.



Gambar 2. Mekanisme reaksi hidrolisis [4]



Gambar 3. Mekanisme reaksi kondensasi [4]

Penambahan asam dilakukan tetes demi tetes hal ini bertujuan untuk mengatur kondisi keasaman pada pH 7. Pada pH 7 jumlah gugus silanol (Si-OH) dan gugus siloksi (Si-O-) berada dalam jumlah yang sama sehingga reaksi pembentukan gel berlangsung cepat dan stabil.



Gambar 4. Nanosilika hasil sintesis

Tabel 1. Pengaruh variasi asam terhadap massa nanosilika hasil sintesis

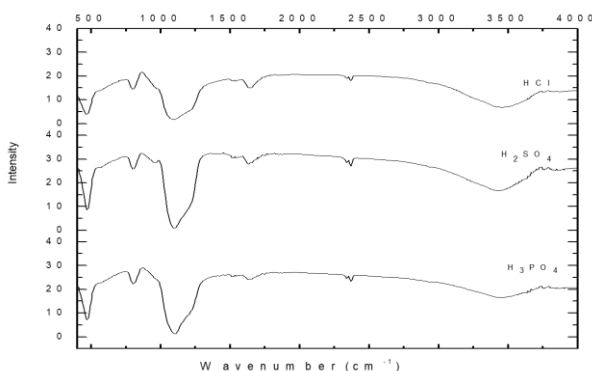
Jenis Asam	Konsentrasi (M)	pH	Hasil setelah furnace (gr)
HCl	3	7	0,7413
H ₂ SO ₄	3	7	1,0377
H ₃ PO ₄	3	7	0,9412

Berdasarkan hasil tabel 1 terlihat bahwa H_2SO_4 menghasilkan serbuk silika dengan massa paling besar. Hal ini dapat dijelaskan berdasarkan perbedaan jumlah H^+ nya. Asam berperan sebagai katalis dan reaktan dalam pembentukan silika gel. Asam klorida merupakan asam monoprotik yang mampu melepaskan $1H^+$ sehingga untuk mencapai kondisi pH 7 jumlah $(Si-OH=Si-O^-)$ membutuhkan jumlah yang lebih banyak dibandingkan H_2SO_4 dan H_3PO_4 . Asam sulfat merupakan asam diprotik yang mampu melepaskan $2H^+$ dan membutuhkan jumlah yang lebih banyak dibandingkan H_3PO_4 untuk mencapai kondisi pH 7, dengan penambahan dalam jumlah yang lebih banyak juga dihasilkan anion dari asamnya dalam jumlah yang lebih banyak sehingga dihasilkan jumlah nanosilika paling banyak. Asam posfat (H_3PO_4) merupakan asam poliprotik yang mampu melepaskan $3H^+$ sehingga membutuhkan jumlah yang paling sedikit untuk mencapai pH 7.

Karakterisasi nanosilika

Nanosilika hasil sintesis dari abu sekam padi dikarakterisasi dengan spektrofotometer IR untuk mengetahui gugus silanol ($Si-OH$) dan siloksan ($Si-O-Si$), *scanning electron microscope* (SEM) untuk mengetahui ukuran morfologi permukaan, dan *gas sorption analyzer* (GSA) untuk mengetahui luas permukaan serta porositas nanosilika hasil sintesis.

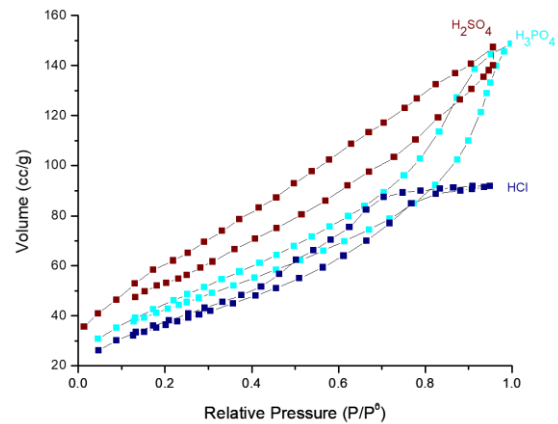
Gambar 5 menunjukkan spektra IR silika yang disintesis dari abu sekam padi dengan variasi jenis asam sebagai reaktan dan katalis. Dilihat dari spektra IR menunjukkan bahwa nanosilika hasil sintesis dengan asam klorida dan asam posfat didominasi oleh gugus siloksan ($Si-O-Si$), hal ini ditunjukkan tidak adanya serapan pada bilangan gelombang 900-an yang menunjukkan vibrasi ikatan gugus silanol ($Si-OH$). Sementara nanosilika yang disintesis dengan katalis asam sulfat menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 900-an.



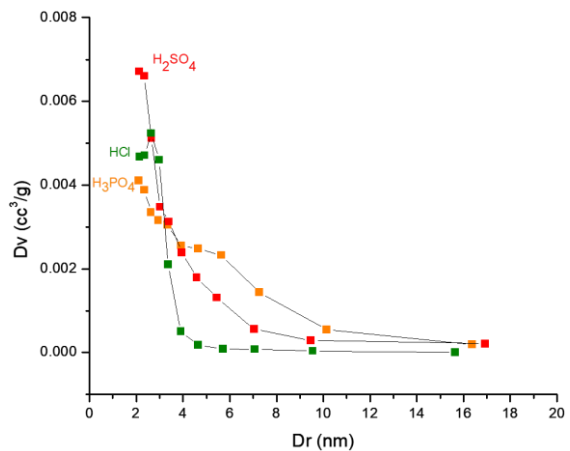
Gambar 5. Spektra IR nanosilika

Tabel 2. Interpretasi spektra IR

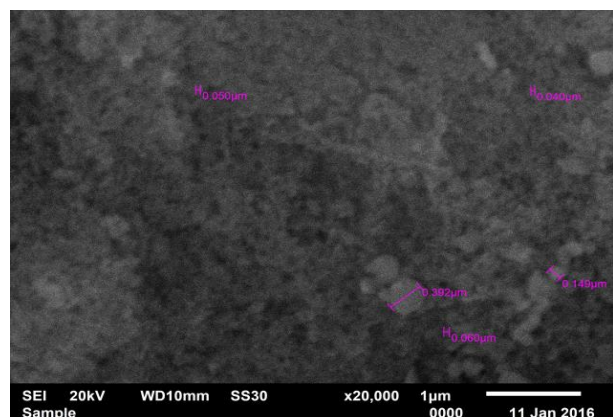
Bilangan gelombang (cm^{-1})			Gugus fungsi
HCl	H_2SO_4	H_3PO_4	
470,63	470,63	470,63	Vibrasi tekuk $\equiv Si-O-Si \equiv$
802,39	802,39	802,39	Vibrasi ulur simetri $\equiv Si-O-Si \equiv$
	956,69		Vibrasi ulur $Si-O$ dari $Si-OH$
1095,57	1103,28	1103,28	Vibrasi ulur asimetri $\equiv Si-O-Si \equiv$
1635,64	1635,64	1635,64	Vibrasi tekuk $O-H$ dari H_2O
3448,72	3452,58	3448,72	Vibrasi ulur $O-H$ dari $\equiv Si-OH$ atau H_2O



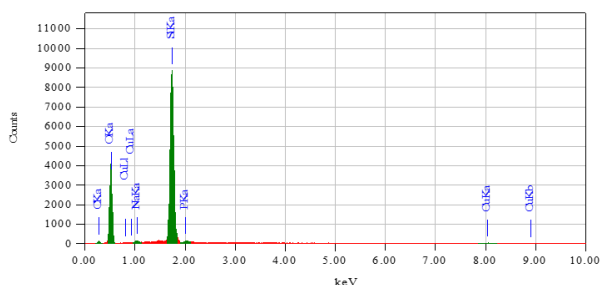
Gambar 6. Kurva isothermal adsorpsi-desorpsi nanosilika hasil sintesis dengan variasi asam



Gambar 7. Kurva distribusi ukuran pori nanosilika hasil sintesis dengan variasi asam



Gambar 8. Citra SEM nanosilika



Gambar 9. EDX nanosilika

Gambar 6 menunjukkan hasil analisis GSA adsorpsi gas nitrogen dari nanosilika hasil sintesis yang digambarkan dengan kurva adsorpsi-desorpsi isothermal. Kurva adsorpsi-desorpsi isothermal nanosilika hasil sintesis dengan variasi asam merupakan kurva isothermal tipe IV (berdasarkan IUPAC) dengan loop histerisis type H2. Loop histerisis disebabkan oleh kondensasi kapiler dan mengindikasikan bahwa nanosilika hasil sintesis tergolong mesopori dengan diameter pori > 2 nm-50 nm. Gambar 7 menunjukkan kurva diferensial distribusi ukuran pori yaitu hubungan bagaimana perubahan ukuran pori terhadap volume pori karena jumlah pori yang banyak. Dapat terlihat bahwa dengan penggunaan asam klorida (HCl) sebagai reaktan dan katalis dalam proses sol-gel menghasilkan nanosilika dengan distribusi pori yang lebih seragam (*uniform*) dibandingkan asam sulfat dan asam posfat. Hal ini ditunjukkan oleh adanya peak pada kurva diferensial distribusi ukuran pori (Dv/Dr). Kurva asam sulfat (H_2SO_4) menunjukkan distribusi ukuran pori yang lebih seragam dibandingkan asam posfat (H_3PO_4) yang menunjukkan distribusi ukuran pori kurang seragam tapi tersebar di beberapa ukuran.

Tabel 3. Luas permukaan, volume total pori, dan ukuran pori nanosilika hasil sintesis dengan variasi asam

Jenis asam	Luas permukaan (m ² /g)	Volume total pori (cc/g)	Diameter pori rata-rata (nm)
HCl	130,867	0,1420	4,34
H ₂ SO ₄	158,168	0,2378	6
H ₃ PO ₄	112,5	0,2274	8

Berdasarkan data pada Tabel 4 terlihat bahwa dengan penggunaan asam sulfat (H_2SO_4) sebagai reaktan dan katalis dalam proses sol-gel menghasilkan nanosilika dengan luas permukaan paling besar meskipun distribusi ukuran pori dengan penggunaan asam klorida lebih seragam, namun intensitas peaknya (gambar 7) lebih tinggi. Sedangkan dengan penggunaan katalis H_3PO_4 menghasilkan luas permukaan paling kecil karena distribusi ukuran porinya tidak seragam dan intensitas peaknya rendah.

Berdasarkan intensitas peak Dv/Dr pada kurva diferensial distribusi ukuran pori menunjukkan volume total pori dan ukuran pori rata-rata pada kurva HCl paling kecil dibandingkan H_2SO_4 dan H_3PO_4 . Hal ini karena distribusi ukuran pori dengan penggunaan asam klorida (HCl) paling seragam pada ukuran pori kecil

yaitu 2-4 nm. Penggunaan katalis H_2SO_4 menghasilkan nanosilika dengan volume total pori paling besar karena luas permukaannya paling besar dengan distribusi ukuran pori yang relative seragam pada ukuran pori 2-7 nm. Sedangkan penggunaan H_3PO_4 menghasilkan nanosilika dengan ukuran pori rata-rata paling besar karena distribusi ukuran porinya tidak seragam tapi tersebar di beberapa ukuran.

Dari citra SEM (Gambar 8) yang diperoleh menunjukkan bahwa nanosilika berhasil disintesis dengan menggunakan katalis asam posfat dengan ukuran morfologi permukaan yaitu 40 sampai 60 nm.

Tabel 4. Data EDX

Unsur	% Massa
O	57,97
Na	0,59
Si	30,06
P	0,40

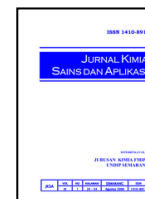
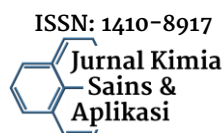
Keberadaan unsur Si dan O berasal dari gugus siloksan (Si-O-Si) dan silanol (Si-OH). Adanya unsur natrium (Na) dan posfor (P) dalam jumlah sedikit berasal dari larutan sodium silikat dan anion posfat (PO_4^{3-}) dari asam yang dihasilkan selama proses gelasi dengan menggunakan asam posfat (H_3PO_4).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa nanosilika berhasil disintesis dengan menggunakan katalis asam posfat dengan ukuran morfologi permukaan 40 sampai 60 nm. Nanosilika yang disintesis dengan penggunaan asam sulfat (H_2SO_4) sebagai katalis dan reaktan menghasilkan luas permukaan dan volume total pori yang lebih besar dibandingkan katalis asam klorida (HCl) dan asam posfat (H_3PO_4), dengan ukuran luas permukaan 158,168 m²/g, volume total pori 0,2378 cc/g, dan diameter pori rata-rata 6 nm.

5. Daftar Pustaka

- [1] K Amutha, R Ravibaskar, G Sivakumar, Extraction, synthesis and characterization of nanosilica from rice husk ash, *International Journal of Nanotechnology and applications*, 4 (2010) 61-66.
- [2] Mohammed Noushad, Ismail Ab Rahman, Noor Sheeraz Che Zulkifli, Adam Husein, Dasmawati Mohamad, Low surface area nanosilica from an agricultural biomass for fabrication of dental nanocomposites, *Ceramics International*, 40 (2014) 4163-4171.
- [3] Tzong-Horng Liou, Chun-Chen Yang, Synthesis and surface characteristics of nanosilica produced from alkali-extracted rice husk ash, *Materials Science and Engineering: B*, 176 (2011) 521-529.
- [4] Lok P. Singh, Sriman K. Bhattacharyya, Rahul Kumar, Geetika Mishra, Usha Sharma, Garima Singh, Saurabh Ahalawat, Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 214 (2014) 17-37.



Studi Pendahuluan tentang Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom Kelapa (*Cocos nucifera* L.)

Dwi Hudiyantri^{a,*}, Desita Triana^a, Parsaoran Siahaan^a

^a Physical Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: dwi.hudiyantri@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords:</p> <p>Coconut Liposomes, Cholesterol, Encapsulation efficiency and Leakage of liposome</p>	<p>The encapsulation of vitamin C in coconut liposomes (<i>Cocos nucifera</i> L.) was studied. The efficiency of encapsulation of coconut liposomes was 80.76%. The addition of cholesterol to the liposome membrane affects the amount of encapsulation efficiency. Addition of cholesterol by 30% increased the efficiency of encapsulation to 92.71%. Temperature affects the ability of coconut liposomes to store vitamin C in 8 days. Storage at 5°C lowers the leakage of coconut liposomes.</p>
<p>Kata kunci:</p> <p>Liposom kelapa, Kolesterol, Efisiensi Enkapsulasi, dan Kebocoran liposom</p>	<p>Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari enkapsulasi vitamin C dalam liposom kelapa (<i>Cocos nucifera</i> L.). Efisiensi enkapsulasi liposom kelapa diperoleh sebesar 80,76%. Penambahan kolesterol pada membran liposom mempengaruhi besarnya efisiensi enkapsulasi. Penambahan kolesterol sebesar 30% meningkatkan efisiensi enkapsulasi menjadi sebesar 92,71%. Suhu mempengaruhi kemampuan liposom kelapa untuk menyimpan vitamin C dalam 8 hari. Penyimpanan pada suhu 5°C menurunkan kebocoran liposom kelapa.</p>

1. Pendahuluan

Liposom adalah struktur *self-assembly* yang saat ini banyak diteliti sebagai pembawa bahan aktif pada bidang farmasi dan pangan. Liposom tersusun dari fosfolipida baik alami maupun sintetik. Dalam penelitian terdahulu [1-3] liposom yang terbuat dari fosfolipida kelapa digunakan untuk mengenkapsulasi senyawa polar 5-*carboxyfluorescein* dan diketahui hanya mampu menyimpan 10% bahan aktifnya setelah 17 jam penyimpanan.

Efisiensi enkapsulasi dan kebocoran pada liposom dipengaruhi oleh komposisi penyusun pada membran bilayer fosfolipid. Komposisi membran ini akan mempengaruhi permeabilitas dan fluiditas membran. Penambahan zat aditif seperti kolesterol mampu meningkatkan efisiensi enkapsulasi dan menurunkan kebocoran [1, 4]. Penambahan kolesterol pada konsentrasi tertentu dapat mengurangi mobilitas

molekul sehingga membran menjadi rigid. Membran bilayer fosfolipid yang rigid menyebabkan permeabilitas serta fluiditas membran menurun sehingga efisiensi enkapsulasi meningkat dan kebocoran berkurang.

Vitamin C merupakan senyawa yang memiliki beragam manfaat bagi manusia, antara lain berperan dalam menghambat pembentukan senyawa karsinogenik, stimulan untuk sintesis kolagen, menghambat penuaan, antioksidan, dan berperan dalam imunitas tubuh terhadap penyakit berbahaya seperti kanker, penyakit jantung, dan penyakit lainnya [5]. vitamin C mudah sekali teroksidasi akibat pengaruh suhu maupun logam berat, reaktif dalam dan berinteraksi dengan komponen makanan lainnya sehingga menyebabkan manfaat vitamin C menjadi berkurang [5-7].

Vitamin C perlu dienkapsulasi untuk melindunginya dari proses teroksidasi maupun

interaksinya dengan senyawa lain selama waktu penyimpanan. Dalam penelitian ini, akan dipelajari kemampuan liposom kelapa dalam mengenkapsulasi vitamin C. Liposom kelapa dimodifikasi dengan menambahkan kolesterol dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, dan 40% (w/w). Selain itu akan diamati pengaruh kolesterol terhadap efisiensi enkapsulasi dan kebocoran liposom kelapa setelah 8 hari penyimpanan dalam suhu 5°C, 25°C, dan 37°C. Sebagai pembanding, digunakan fosfolipid kedelai yang telah banyak digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat liposom dalam berbagai aplikasi [6, 7].

2. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fosfolipida kelapa (*Cocos nucifera L.*) hasil isolasi *in house*, Kloroform p.a, methanol p.a, NaCl p.a, n-Heksan, aquades, alkohol 96%, *DI water*, Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, vitamin C (uncoated), kolesterol dari Sigma Aldrich, lesitin kedelai dari Sigma Aldrich, Fast Blue B Salt dari Sigma Aldrich, EDTA p.a, NaOH p.a dan Asam asetat 99 % dari Merck.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender Maspion MT-1206, corong pisah dengan kran teflon, timbangan (Kern ALS 220-4N), kertas saring whattman 1442-090 Grade No.42:90mm-100/pk, *magnetic stirrer* Thermolyne Cimarec, *rotary evaporator*, *shaker*, *ultrasonic cleaner* (Krisbow), timbangan, vortex mixer (VM-300), *centrifuge* (Hettich EBA 20). Instrumensasi untuk analisis adalah *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dengan merk prestige-21 Shimadzu, *Gas Chromatography-Mass Spectrometri* (GCMS) QP2010S-Shimadzu, dan Spektrometer UV-Vis Spectroquant Pharo 300.

Metode

Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom Kelapa

Campuran fosfolipid dan kolesterol diformulasikan dengan perbandingan sebagai berikut:

Tabel 1. Campuran fosfolipid dan kolesterol

Kadar kolesterol (b _k /(b _f +b _k))	Massa bahan (mg)	
	Fosfolipid	Kolesterol
0	74	-
10	66,6	7,4
20	59,2	14,8
30	51,8	22,2
40	44,4	29,6

b_k: berat kolesterol, b_f: berat fosfolipida

Campuran fosfolipid dan kolesterol dilarutkan dalam 100 mL kloroform sehingga diperoleh larutan baku fosfolipid dengan konsentrasi kolesterol 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, dan 40 %. Kloroform merupakan pelarut semipolar sehingga dapat melarutkan fosfolipid dan kolesterol yang cenderung semipolar.

Pembuatan liposom dilakukan menurut metode yang diberikan oleh Hudiyanti, *dkk* [1, 2]. Larutan baku fosfolipida dengan konsentrasi 100 ppm sebanyak 75 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya dialiri gas nitrogen hingga terbentuk lapis tipis. Vitamin C 100 ppm dalam buffer fosfat ditambahkan ke dalam lapis tipis. Selanjutnya dilakukan *freeze thawing* (pendinginan pada suhu 5°C, pemanasan pada suhu 50°C dan pengocokan dengan vortex mixer) dan dilanjutkan dengan sonikasi.

Efisiensi Enkapsulasi

Penentuan efisiensi enkapsulasi dilakukan sesuai dengan metode Yang, *dkk*. [7], sebanyak 4 mL larutan liposom yang telah siap dianalisis disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan larutan yang mengandung vitamin C bebas diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 0,3 mL EDTA (0,25 M), 0,5 mL asam asetat (0,5 M), dan 1,25 mL garam fast blue B (2 g/L) secara berurutan. Setelah itu campuran diencerkan sampai 10 mL dengan *DI water*. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Nilai efisiensi enkapsulasi vitamin C (*EE_{vit.c}*) didapat dengan menghitung konsentrasi vitamin C tidak terenkapsulasi (*C_{sis}*) dan dibandingkan dengan konsentrasi vitamin C sebelum dienkapsulasi (*C_{awal}*), sesuai dengan persamaan:

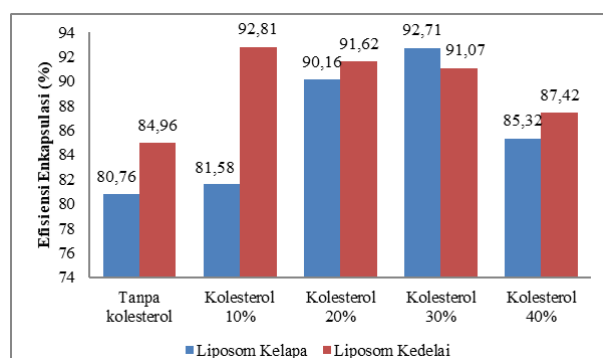
$$EE_{vit.c} = [1 - (C_{sis}/C_{awal})] \times 100\%$$

Kebocoran Liposom

Untuk menentukan daya simpan liposom kelapa sebagai penghantar dalam sistem penghantaran obat, dilakukan analisis kebocoran. Sampel liposom yang telah siap dianalisis disimpan selama 8 hari dalam tiga suhu yang berbeda, yaitu suhu dingin (5°C), suhu ruang (25°C), dan suhu inkubator (37°C). Kebocoran pada liposom ditentukan dengan menghitung konsentrasi vitamin C yang terlepas dari sistem liposom setelah 8 hari penyimpanan. Pengujian kebocoran liposom sama dengan prosedur pengujian efisiensi enkapsulasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Enkapsulasi Vitamin C dalam Liposom



Gambar 1. Nilai Efisiensi Enkapsulasi liposom kelapa dan kedelai

Enkapsulasi vitamin C dalam liposom dilakukan dalam medium buffer fosfat pH 7,4. Penggunaan *buffer*

fosfat pH 7,4 sesuai dengan pH fisiologis dalam tubuh. Proses enkapsulasi dilakukan melalui proses pendinginan, kemudian pemanasan pada suhu 50°C, dan pengadukan dengan *vortex mixer*. Pada proses ini lapis tipis pada dinding tabung akan terangkat dan terdispersi sempurna sebagai liposom [3]. Saat lapis tipis telah terdispersi seluruhnya, dispersi akan menjadi keruh. Keruhnya dispersi ini menandakan liposom yang terbentuk termasuk dalam kategori *Multilamellar Vesicle* (MLV) [1, 8]. Dispersi liposom selanjutnya disonikasi untuk memperkecil ukuran partikelnya. Semakin lama disonikasi, maka partikel yang terbentuk akan semakin kecil yang ditandai dengan dispersi yang menjadi lebih jernih.

Analisis Efisiensi Enkapsulasi Vitamin C

Sruktur liposom yang tersusun oleh membran fosfolipida dalam bentuk bola (*sphere*) memungkinkan liposom untuk mengenkapsulasi bahan aktif bersifat polar di dalam rongga (*core*) strukturnya [3]. Dalam penelitian ini vitamin C yang bersifat polar dienkapsulasi dalam liposom dari fosfolipida kelapa. Analisis efisiensi enkapsulasi bertujuan untuk mengetahui kemampuan liposom kelapa dalam mengenkapsulasi vitamin C pada berbagai konsentrasi kolesterol. Sebagai pembanding, dilakukan analisa efisiensi enkapsulasi pada liposom dari fosfolipid kedelai karena liposom kedelai telah banyak digunakan dalam bidang farmasi.

Nilai efisiensi enkapsulasi keduanya disajikan dalam gambar 1. Secara keseluruhan efisiensi enkapsulasi pada liposom kelapa lebih rendah dibandingkan efisiensi enkapsulasi pada liposom kedelai. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan jenis rantai asam dalam fosfolipida penyusun liposomnya. Rantai asam lemak penyusun fosfolipid kelapa adalah C8:0 dan C12:0, sedangkan rantai asam lemak penyusun fosfolipid kedelai yaitu C16:0 dan C18:2 [1]. Menurut Maherani, *dkk.* [9] efisiensi enkapsulasi liposom bergantung pada kekakuan membran bilayer liposomnya. Panjang rantai asil akan mempengaruhi ketebalan dan interaksi antar rantai asil di dalam membran. Fosfolipida dengan rantai asil yang panjang akan memberikan interaksi yang lebih kuat serta menambah ketebalan, sehingga membran menjadi kurang cair atau kaku. Bilayer liposom kelapa tersusun atas rantai asil yang pendek, sehingga interaksi antar rantai asil kurang kuat dan membran menjadi kurang kaku dibandingkan liposom kedelai. Hal ini menyebabkan liposom kelapa lebih sulit mengenkapsulasi vitamin C dari pada liposom kedelai sehingga efisiensi enkapsulasinya menjadi lebih rendah.

Liposom kelapa menunjukkan nilai efisiensi enkapsulasi tertinggi pada konsentrasi kolesterol 30% yang bernilai 92,71%. Nilai efisiensi enkapsulasi ini meningkat sebanyak 11,95% dibandingkan liposom kelapa tanpa penambahan kolesterol. Sementara itu, nilai efisiensi enkapsulasi tertinggi pada liposom kedelai dengan konsentrasi kolesterol 10% yaitu bernilai 92,81%. Nilai efisiensi enkapsulasi ini meningkat sebanyak 7,85%. Penambahan kolesterol meningkatkan

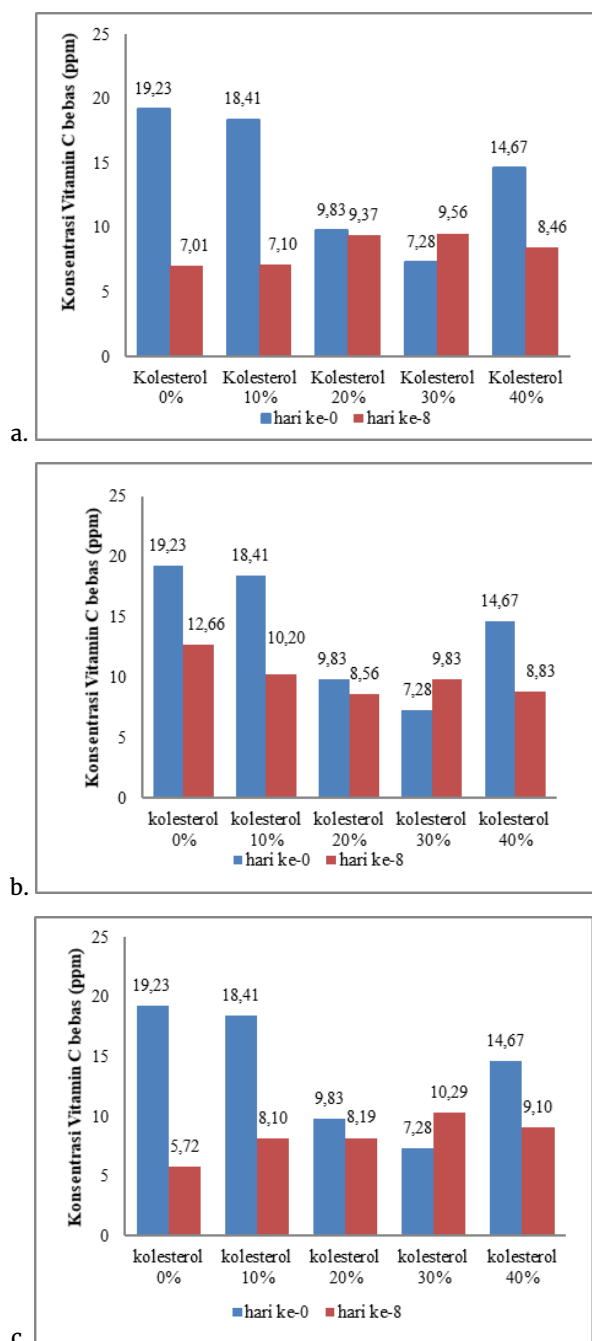
nilai efisiensi enkapsulasi pada liposom kelapa lebih besar dibandingkan liposom kedelai. Data ini menunjukkan bahwa kolesterol berinteraksi lebih baik pada bilayer fosfolipida kelapa dibandingkan dengan fosfolipida kedelai. Fosfolipida kelapa memiliki rantai asil pendek dengan interaksi antar rantai yang kurang kuat sehingga kolesterol lebih mudah menempatkan dirinya di dalam membran fosfolipida tersebut. Akibatnya kolesterol akan memperkuat interaksi antar rantai asilnya sehingga enkapsulasi vitamin C dalam liposom kelapa menjadi lebih maksimal.

Analisis Kebocoran pada Liposom

Pada penelitiannya Hudiyanti, *dkk.* [1] telah mengetahui bahwa liposom kelapa mengalami kebocoran ketika digunakan untuk menyimpan senyawa polar 5-carboxyfluorescein selama 17 jam. Dalam penelitian itu pula diketahui bahwa kolesterol secara efektif dapat mengurangi kebocoran tersebut. Pada penelitian ini liposom digunakan untuk menyimpan vitamin C dalam 3 suhu yang berbeda yaitu suhu 5°C, 25°C, dan 37°C selama 8 hari. Secara keseluruhan pengujian kebocoran pada liposom kelapa dilakukan dengan menghitung konsentrasi vitamin C bebas pada setiap supernatannya. Profil kebocoran liposom kelapa dapat dilihat pada gambar 2. Profil tersebut menggambarkan bahwa suhu penyimpanan mempengaruhi kebocoran liposom kelapa. Pada suhu penyimpanan 5°C kebocoran liposom kelapa terlihat paling rendah.

Konsentrasi vitamin C dalam supernatan dipengaruhi oleh adanya kebocoran dari dalam liposom serta proses degradasi dari vitamin C karena adanya reaksi oksidasi [10]. Proses kebocoran akan menambah jumlah vitamin C pada supernatan sedangkan proses degradasi akan menurunkan konsentrasinya. Oleh karenanya apabila konsentrasi vitamin C bebas yang diperoleh menunjukkan peningkatan maka artinya proses kebocoran lebih dominan. Sementara itu apabila konsentrasi yang diperoleh menurun maka proses degradasi lebih menentukan.

Secara keseluruhan data pada gambar 2 menunjukkan bahwa pada umumnya konsentrasi vitamin C bebas pada supernatan mengalami penurunan setelah 8 hari penyimpanan. Sehingga dapat diartikan proses degradasi vitamin C dalam sampel lebih dominan daripada proses kebocoran dari dalam liposom. Selanjutnya jika diasumsikan bahwa kecepatan degradasi pada suhu yang sama adalah konstan maka besarnya perubahan konsentrasi vitamin C setelah penyimpanan (8 hari) terhadap konsentrasi awal (0 hari) sebanding dengan besarnya kebocoran. Dengan demikian maka dapat diketahui dari data tersebut bahwa perubahan konsentrasi kolesterol mempengaruhi kebocoran vitamin C.



Gambar 2. Kebocoran Vitamin C pada penyimpanan (a) 5°C, (b) 25°C, dan (c) 37°C

4. Kesimpulan

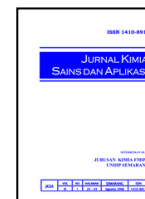
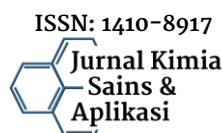
Efisiensi enkapsulasi liposom kelapa diperoleh sebesar 80,76%. Penambahan kolesterol pada membran liposom mempengaruhi besarnya efisiensi enkapsulasi. Penambahan kolesterol sebesar 30% meningkatkan efisiensi enkapsulasi menjadi sebesar 92,71%. Suhu mempengaruhi kemampuan liposom kelapa untuk menyimpan vitamin C. Penyimpanan pada suhu 5°C menurunkan kebocoran liposom kelapa.

5. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dana dari Hibah Penelitian Fundamental PNBPU Undip 2015

6. Daftar Pustaka

- [1] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito, Sri Noegrohati, Study on Leakage of Sesame (*Sesamum indicum* L.) and Coconut (*Cocos nucifera* L.) Liposomes, *Oriental Journal of Chemistry*, 31, 1, (2015) 435-439 <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310152>
- [2] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito Narsito, Sri Noegrohati, Isolasi dan Karakterisasi Lesitin Kelapa dan Wijen, *Agritech*, 32, 1, (2012) 23-26 <https://doi.org/10.22146/agritech.9652>
- [3] Dwi Hudyanti, Tri Joko Raharjo, Narsito Narsito, Sri Noegrohati, Investigation on the morphology and properties of aggregate structures of natural phospholipids in aqueous system using cryo-tem, *Indonesian Journal of Chemistry*, 12, 1, (2012) 57-61
- [4] Maria-Lucia Briuglia, Chiara Rotella, Amber McFarlane, Dimitrios A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Delivery and Translational Research*, 5, 3, (2015) 231-242 10.1007/s13346-015-0220-8
- [5] Shabbar Abbas, Chang Da Wei, Khizar Hayat, Zhang Xiaoming, Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review, *Food Reviews International*, 28, 4, (2012) 343-374 10.1080/87559129.2011.635390
- [6] Lan Chang, Yongsheng Zhao, Studies on Preparation and Properties of Vc Nano Liposomes, *Journal of Applied Science and Engineering Innovation*, 1, 4, (2014) 234-240
- [7] Shuibing Yang, Wei Liu, Chengmei Liu, Weilin Liu, Guihong Tong, Huijuan Zheng, Wei Zhou, Characterization and Bioavailability of Vitamin C Nanoliposomes Prepared by Film Evaporation-Dynamic High Pressure Microfluidization, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33, 11, (2012) 1608-1614 10.1080/01932691.2011.629511
- [8] Arkadiusz Kozubek, Jerzy Gubernator, Ewa Przeworska, Maria Stasiuk, Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes, *Acta Biochimica Polonica*, 47, 3, (2000) 639-649
- [9] B. Maherani, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani, M. Linder, Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies, *Current Nanoscience*, 7, 3, (2011) 436-452 10.2174/157341311795542453
- [10] Gerald F. Combs Jr, James P. McClung, Chapter 10 - Vitamin C, in: *The Vitamins (Fifth Edition)*, Academic Press, 2017, pp. 267-295.



Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Produk Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu menggunakan Bakteri Asam Laktat Komersial

Kunti Nadiyah S. Muthia^{a,*}, Purbowatiningrum Ria Sarjono^a, Agustina L. N. Aminin^{a,*}

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: agustina.aminin@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

antibacterial,
antioxidant,
fermentation, tofu
Whey, soymilk

Kata kunci:
Antibakteri,
Antioksidan,
fermentasi, *Whey*
tahu, susu kedelai

Abstract

The potential of antibacterial and antioxidant activity of fermented soy milk and *Whey* tofu products by lactic acid bacteria (BAL) has been explored in this study. Fermentation was performed using commercial lactic acid bacteria and incubated at 45°C. for 7 hours. Antibacterial activity was observed against pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Antioxidants were tested using the Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) method and scavenging DPPH. The results showed fermented product of soy milk in the form of white lumps with pH 5.4 whereas tofu *Whey* in the form of liquid mixture and yellow cloudy solid with pH 4,7. The fermentation results do not give inhibition to the growth of pathogenic bacteria. Fermented soy milk and *Whey* tofu products have a FCR antioxidant capacity of 0.07 mg of gallic acid / gram of sample and 0.04 mg of gallic acid / gram of sample. At 90 ppm each product capable of inhibiting free radical DPPH of 12.53% and 11.46% so potentially as an antioxidant.

Abstrak

Potensi aktifitas antibakteri dan antioksidan produk fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh bakteri asam laktat (BAL) telah dieksplorasi dalam penelitian ini. Fermentasi dilakukan menggunakan bakteri asam laktat komersil dan dinkubasi pada 45°C selama 7 jam. Aktifitas antibakteri diamati terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Antioksidan diuji dengan metode Folin- Ciocalteu Reagen (FCR) dan peredam DPPH. Hasil penelitian menunjukkan produk fermentasi susu kedelai berupa gumpalan berwarna putih dengan pH 5,4 sedangkan pada *Whey* tahu berupa campuran cairan dan padatan berwarna kuning keruh dengan pH 4,7. Hasil fermentasi tidak memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Produk fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu memiliki kapasitas antioksidan FCR sebesar 0,07 mg asam galat/gram sampel dan 0,04 mg asam galat/gram sampel serta pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu menghambat radikal bebas DPPH sebesar 12,53% dan 11,46% sehingga berpotensi sebagai antioksidan.

1. Pendahuluan

Whey merupakan produk samping dari proses pembuatan tahu mengandung total protein 0,138%; total pati 0,855% dan total gula 1,128% serta isoflavon

sebesar 20,77% relatif terhadap total isoflavon kedelai. Kandungan nutrisi *Whey* tahu tersebut berpotensi sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* [1] dan *Lactobacillus paracasei* [2]. Harmayani *dkk.* [3] telah memanfaatkan

Whey tahu untuk media pertumbuhan bakteri *Pediococcus acidilactici* penghasil bakteriosin.

BAL dalam pertumbuhannya menghasilkan metabolit primer yaitu asam laktat, CO₂, diasetil, asetaldehida dan hidrogen peroksida serta metabolit sekunder yaitu bakteriosin yang berpotensi sebagai antibakteri. Adanya asam laktat menyebabkan penurunan pH sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang optimum pada pH 6–7. Fermentasi oleh BAL juga menghasilkan bakteriosin yaitu bioaktif peptida atau protein yang memiliki aktifitas antimikroba terutama terhadap bakteri gram positif yang berkaitan dengan kerusakan makanan maupun bakteri patogen [4, 5]. Nurhajati dkk. [6] mengemukakan bahwa bakteriosin diproduksi oleh bakteri asam laktat pada awal fase log kemudian mencapai maksimum pada awal fase stasioner dan mengalami penurunan pada akhir fase stasioner hingga fase kematian.

Fermentasi BAL juga mengakibatkan protein kedelai mengalami hidrolisis menjadi peptida-peptida pendek diantaranya Phe-Asp-His-Val-Glu dan Phe-Asn-His-Leu-Asp-His yang mampu meredam radikal bebas DPPH [7]. Fermentasi menyebabkan senyawa isoflavon dalam kedelai mengalami transformasi sehingga diperoleh senyawa isoflavon bebas yaitu aglikon berupa genistein, glisitein dan daidzein yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada bentuk terikatnya [7].

Dalam penelitian ini dilakukan fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu dengan menggunakan BAL dan penentuan aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram. Uji antioksidan dari ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu menggunakan metode Folin-Ciocalteu Reagen (FCR) dan metode peredaman 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

2. Metodologi Penelitian

Bahan

Filtrat *Whey* tahu yang telah dipekatkan yang berasal dari pabrik tahu di kelurahan Beji kecamatan Ungaran Timur, susu kedelai “Bukit Sari”, laktosa, BAL (*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus acidophilus*), susu sapi segar yang berasal dari KUD Banyumanik, medium nutrient broth, bacto agar, akuades, ampisilin, tetrasiklin, DPPH, kuersetin, metanol, Folin-ciocalteu, asam galat, Na₂CO₃, BSA, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Cara Kerja.

Penyiapan Starter BAL

Seratus mililiter BAL komersial yang diketahui mengandung *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacteria* diremajakan terlebih dahulu dalam 1 L susu sapi steril dan diinkubasi pada suhu 45°C [8] selama 4 jam. Sebanyak 10 mL hasil peremajaan ini ditambahkan ke dalam 200 mL susu kedelai steril yang telah ditambahkan laktosa sebanyak 0,5% dan diinkubasi

pada suhu 45°C selama 4 jam. Hasil inkubasi BAL dalam susu kedelai ini digunakan untuk starter.

Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu

Susu kedelai dan *Whey* tahu steril masing-masing sebanyak 500 mL ditambahkan dengan laktosa masing-masing sebanyak 2,5 g. Sebanyak 25 mL starter BAL ditambahkan ke dalam masing-masing susu kedelai dan *Whey* tahu pada suhu 45°C. Selanjutnya dilakukan penginkubasian selama 7 jam pada suhu 45°C. Larutan ekstrak hasil fermentasi diperoleh dengan menyentrifus hasil fermentasi pada 5000rpm selama 30 menit.

Uji Antibakteri Ekstrak Hasil Fermentasi

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram dan metode perforasi. Metode difusi cakram yaitu dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL masing-masing selama 15 menit ke dalam cawan petri berisi media NA dan bakteri uji. Metode perforasi yaitu dengan menuangkan 10µL ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL ke lubang sumur (diameter 6 mm) dalam cawan petri yang berisi media NA (tebal 5 mm) dan bakteri uji [6].

Uji Antioksidan Metode FCR

Penentuan aktivitas antioksidan metode FCR dilakukan dengan cara 0,2 mL larutan uji direaksikan dengan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu, kemudian dikocok dan didiamkan selama 8 menit. Sebanyak 3 mL larutan Na₂CO₃ 20% dalam akuades ditambahkan ke dalam larutan tersebut kemudian dikocok hingga larutan homogen dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan pada panjang gelombang 765 nm. Standar yang digunakan adalah asam galat

Uji Antioksidan Metode DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan metode DPPH dilakukan dengan cara pembuatan variasi konsentrasi larutan uji 10, 30, 50, 70, dan 90 µg/mL. Sebanyak 0,2 mL masing-masing konsentrasi larutan uji ditempatkan dalam botol vial dan ditambahkan dengan 3,8 mL larutan DPPH 50 µM. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit di ruangan gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai standar digunakan kuersetin [9].

3. Hasil dan Pembahasan

Fermentasi Susu Kedelai dan *Whey* Tahu

Hasil pengamatan susu kedelai dan *Whey* tahu sesudah fermentasi pada susu kedelai berupa padatan berwarna putih dengan pH 5,4 sedangkan pada *Whey* tahu berupa campuran cairan dan padatan berwarna kuning keruh dengan pH 4,7. Menurut Tamime dan Robinson [10] katabolisme dari kultur starter BAL akan menghasilkan asam laktat yang menyebabkan penurunan pH sehingga terjadi koagulasi. Koagulasi pada susu kedelai menunjukkan tekstur yang kompak

sedangkan koagulasi pada *Whey* tahu hanya menunjukkan peningkatan padatan yang bercampur dengan cairan. Hal ini terjadi karena protein susu kedelai lebih banyak daripada *Whey* tahu.

Uji antibakteri

Uji antibakteri dengan metode difusi cakram maupun metode perforasi memberikan hasil yang negatif seperti tampak pada tabel 1.

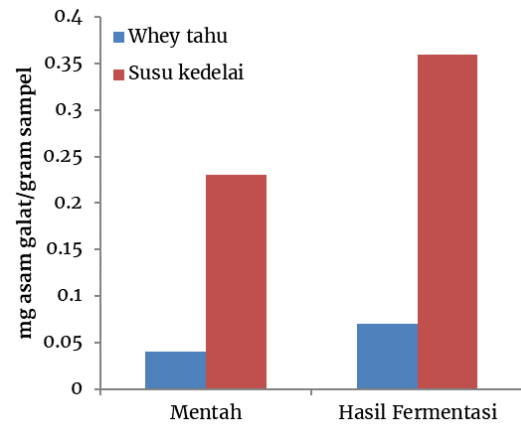
Tabel 1. Uji antibakteri

Bakteri Uji	Hasil Fermentasi	
	Susu kedelai	<i>Whey</i> tahu
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-

Dalam penelitian ini diperoleh hasil ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu dengan pH 5,4 dan pH 4,7 tidak memberikan penghambatan pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* karena pH nya masih diatas pH minimum bakteri tersebut. Jordan dkk. [11] menyatakan bahwa nilai pH minimum pertumbuhan *E. coli* adalah 4,3-4,4. *S. aureus* memiliki pH optimum 6-7 walaupun masih dapat tumbuh pada kisaran pH 4-10. Menurut Lambert dan Stratford [12] *P. aeruginosa* memiliki pH minimum 4,6. *Staphylococcus aureus* dan *P. aeruginosa* memiliki toleransi terhadap kisaran lingkungan yang luas. *P. aeruginosa* memiliki keragaman genetik yang tinggi dan memiliki plasmid yang mengkode enzim pada jalur metabolisme khusus, sehingga mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti pada medium yang cukup asam. *S. aureus* memiliki plasmid yang membawa gen untuk kekebalan terhadap senyawa antibakteri. pH kurang asam diperkirakan karena waktu fermentasi yang relatif singkat yaitu hanya 7 jam. Pada suhu 45°C cepat terjadi penggumpalan dalam waktu 7 jam namun diperkirakan belum mencapai tahap maksimal. Selain itu juga fermentasi oleh BAL pada suhu cukup tinggi yaitu 45°C diperkirakan pertumbuhan BAL belum mencapai fase stasioner sehingga belum memproduksi bakteriosin.

Uji Antioksidan Metode FCR

Kapasitas antioksidan FCR susu kedelai terukur tinggi seperti terlihat dalam gambar 1, karena susu kedelai diketahui merupakan suplemen makanan yang mengandung senyawa fenolik dan isoflavon. Senyawa fenolik dan isoflavon bersifat larut air sehingga mampu terukur dengan baik menggunakan metode FCR.

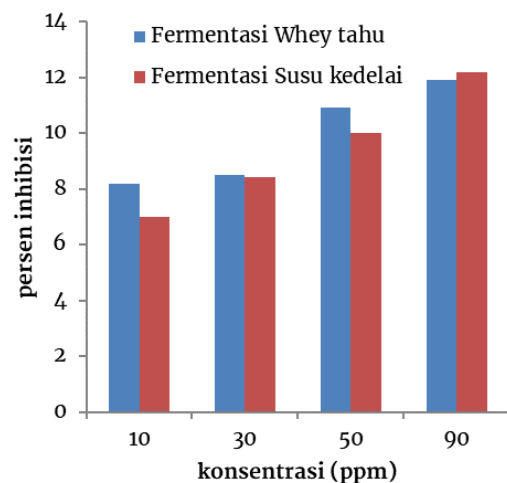


Gambar 1. Kapasitas antioksidan dengan metode FCR

Whey tahu memiliki kapasitas antioksidan 53,49% dari total kapasitas antioksidan susu kedelai serta ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu oleh BAL memiliki kapasitas antioksidan 57,14% dari total kapasitas antioksidan ekstrak hasil fermentasi susu kedelai oleh BAL. Hal ini membuktikan bahwa *Whey* tahu dan ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu oleh BAL berpotensi sebagai antioksidan. *Whey* tahu merupakan produk samping dari pembuatan tahu yang diketahui mengandung isoflavon yaitu anggota flavonoid yang mengandung senyawa polifenol.

Uji Antioksidan metode peredaman DPPH

Gambar 2 menunjukkan perbandingan persentase inhibisi susu kedelai dan *Whey* tahu serta ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh BAL. Persentase inhibisi dalam tiap sampel dengan konsentrasi yang sama menunjukkan rata-rata persentase inhibisi *Whey* tahu lebih besar dibandingkan dengan susu kedelai serta ekstrak hasil fermentasi *Whey* tahu lebih besar dibandingkan ekstrak hasil fermentasi susu kedelai.



Gambar 1. Kapasitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH

Penghambatan radikal DPPH terbesar yaitu pada konsentrasi 90 ppm. Susu kedelai dan *Whey* tahu pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu

menghambat radikal bebas DPPH sebesar 23,16% dan 19,26%. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu pada konsentrasi 90 ppm masing-masing mampu menghambat radikal bebas DPPH sebesar 12,53% dan 11,46% sehingga berpotensi sebagai antioksidan

4. Kesimpulan

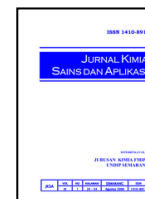
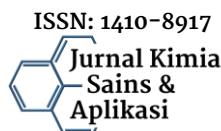
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu oleh bakteri asam laktat pada suhu 45°C selama 7 jam menghasilkan asam-asam organik yang menyebabkan susu kedelai mengalami koagulasi membentuk padatan berwarna putih dan *Whey* tahu membentuk padatan bercampur cairan berwarna kuning keruh serta ditandai penurunan pH
2. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu tidak memberikan terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*
3. Ekstrak hasil fermentasi susu kedelai dan *Whey* tahu berpotensi sebagai antioksidan

5. Daftar Pustaka

- [1] W. Ben Ounis, C. P. Champagne, J. Makhlouf, L. Bazinet, Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17, *Desalination*, 229, 1, (2008) 192-203
<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.08.019>
- [2] Lê Nguyen Thi, Claude P. Champagne, Byong H. Lee, Jacques Goulet, Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey, *International Journal of Food Microbiology*, 89, 1, (2003) 67-75
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00109-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00109-0)
- [3] Eni Harmayani, Endang S. Rahayu, Titiek F. Djaafar, Citra Argaka Sari, Tri Marwati, Pemanfaatan Kultur *Pediococcus Acidilactici* F-11 Penghasil Bakteriosin Sebagai Penggumpal pada Pembuatan Tahu, *Jurnal Pascapanen*, 6, 1, (2009) 10-20
- [4] J. R. Tagg, A. S. Dajani, L. W. Wannamaker, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40, 3, (1976) 722-756
- [5] Todd R. Klaenhammer, Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70, 3, (1988) 337-349
[http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4)
- [6] Jetty Nurhajati, Chrysanti, Ida Indrawati, Novi Syaftika, Antibacterial Activity of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* Soygurt Cultures, 3rd ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, Thailand, (2008).
- [7] Issoufou Amadou, Olasunkanmi S. Gbadamosi, Yong Hui Shi, Mohamed T. Kamara, Sun Jin, Guo-Wei Le, Identification of Antioxidative Peptides from *Lactobacillus plantarum* Lp6 Fermented Soybean Protein Meal, *Research Journal of Microbiology*, 5, 5, (2010) 372-380
<http://dx.doi.org/10.3923/jm.2010.372.380>
- [8] Marman Wahyudi, Proses pembuatan dan analisis mutu yoghurt, *Buletin Teknik Pertanian*, 11, 1, (2006) 12-16

- [9] Philip Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2, (2004) 211-219
- [10] Adnan Y Tamime, Richard Kenneth Robinson, *Yoghurt: science and technology*, Woodhead Publishing, 1999.
- [11] Kieran N. Jordan, Lynn Oxford, Conor P. O'Byrne, Survival of Low-pH Stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between Alterations in the Cell Envelope and Increased Acid Tolerance, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 7, (1999) 3048-3055
- [12] R. J. Lambert, M. Stratford, Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 1, (1999) 157-164
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x>



Adsorpsi Alkil Benzena Sulfonat Menggunakan Zeolit Termodifikasi *Cetyltrimethylammonium*

Anis Komariah^a, Sriatun^{a,*}, Pardoyo^a

^a Inorganic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: sriatun@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: ZMS (Zeolite Modified Surfactant), Adsorption, Alkyl Benzene Sulfonate</p>	<p>In this research, modification of NH_4Cl (H-Zeolite) activated zeolite with CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) surfactant of various concentrations of 0.25 mM (ZMS-1), 1 mM (ZMS-2) and 100 mM (ZMS-3) as an Alkyl Benzene Sulfonate (ABS) compound adsorbent has been conducted. Characterization was performed on H-Zeolite and ZMS using FTIR spectrophotometer. The main parameters in this study were variation of concentration of ABS (50, 75, and 100 ppm) and contact time (15, 30, 45, 60, 75, and 90 min). The adsorbed ABS concentration was analysed by UV-Vis spectrophotometer using the MBAS (Methylene Blue Active Substance) method. The result of FTIR spectra of modified surfactant modified zeolite (ZMS) showed peak at wave number $2931,80\text{ cm}^{-1}$; $2854,65\text{ cm}^{-1}$ and $1404,18\text{ cm}^{-1}$ indicating the presence of CTAB group on zeolite. The maximum concentration and optimum time ABS that could be absorbed by 0.1 gram ZMS was 50 ppm in 25 mL at 60 minutes with adsorption percentage of 84.04% for H-Zeolite; 96.42% for ZMS-1; 96.48% for ZMS-2; And 97.29% for ZMS-3. ZMS performance tended to increase with CTAB concentration in zeolites.</p>
<p>Kata kunci: ZMS (Zeolit Modifikasi Surfaktan), Adsorpsi, Alkil Benzena Sulfonat</p>	<p>Abstrak</p> <p>Dalam penelitian ini dilakukan modifikasi zeolit alam teraktivasi NH_4Cl (H-Zeolit) dengan surfaktan CTAB (<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>) berbagai konsentrasi yaitu sebesar 0,25 mM (ZMS-1), 1 mM (ZMS-2), dan 100 mM (ZMS-3) sebagai adsorben senyawa ABS (Alkil Benzena Sulfonat). Karakterisasi dilakukan terhadap H-Zeolit dan ZMS menggunakan spektrofotometer FTIR. Parameter utama dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ABS (50, 75, dan 100 ppm) dan waktu kontak (15, 30, 45, 60, 75, dan 90 menit). Konsentrasi ABS yang teradsorpsi dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode MBAS (<i>Methylene Blue Active Substance</i>). Hasil spektra FTIR zeolit alam termodifikasi surfaktan (ZMS) menunjukkan puncak pada bilangan gelombang $2931,80\text{ cm}^{-1}$; $2854,65\text{ cm}^{-1}$ dan $1404,18\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan keberadaan gugus CTAB pada zeolit. Konsentrasi maksimum dan waktu optimum ABS yang dapat dijerap oleh per 0,1 gram ZMS adalah 50 ppm dalam 25 mL pada waktu 60 menit dengan persen adsorpsi sebesar 84,04% untuk H-Zeolit ; 96,42% untuk ZMS-1; 96,48% untuk ZMS-2; dan 97,29% untuk ZMS-3. Performa ZMS cenderung meningkat dengan konsentrasi CTAB pada zeolit.</p>

1. Pendahuluan

Detergen yang digunakan rumah tangga (masyarakat umum dan usaha *laundry* pakaian),

umumnya mengandung surfaktan yang merupakan zat aktif permukaan seperti Alkil Benzena Sulfonat (ABS) yang berbahaya bagi organisme air karena dapat menurunkan konsentrasi oksigen dalam air dan

memberikan efek karsinogenik, sehingga kehidupan organisme air akan terganggu bahkan mati [1]. Senyawa ABS mempunyai struktur rantai bercabang dan stabil, sehingga memiliki tingkat *biodegradable* yang sangat rendah. Di Indonesia ABS masih digunakan karena relatif murah dan stabil saat proses produksinya. Metode konvensional untuk degradasi surfaktan dari air antara lain oksidasi elektrokimia, teknologi membran, presipitasi kimia, fotokatalitik, adsorpsi dan metode biologis.

Menurut Taffarel dan Rubio [2], adsorpsi senyawa organik seperti surfaktan anionik paling efektif menggunakan resin penukar ion zeolit ataupun karbon aktif. Selain itu telah dilakukan adsorpsi surfaktan linier alkil benzene sulfonat (LAS) menggunakan karbon nanotube (CNT) termodifikasi karboksil [3], menggunakan karbon dari tempurung kelapa [4], menggunakan bentonit alam [4] dan menggunakan magnetit [5].

Zeolit merupakan kristal aluminasilikat yang mempunyai struktur tiga dimensi, tersusun atas unsur utama aluminium, silikon dan oksigen serta pengotor seperti air dan kation penyeimbang golongan alkali atau alkali tanah. Xia *dkk.* [6], Zhang *dkk.* [7], dan Zhou [8] menyatakan bahwa faktor luas permukaan, keasaman, sifat porous dan KPK (Kapasitas Penukar Kation) zeolit yang tinggi menyebabkan bahan ini banyak diaplikasikan sebagai penyerap selektif, penukar ion, serta katalis. Zeolit alam biasanya mempunyai karakter rasio Si/Al yang rendah, misalnya zeolit alam Bayat, Klaten, Jawa Tengah, mempunyai rasio Si/Al 2,852 [9]. Kandungan alumina pada kerangka zeolit alam yang tinggi mengakibatkan konsentrasi kation penyeimbang pada permukaan zeolit juga tinggi, sehingga menyebabkan strukturnya berkarakter hidrofilik dan mempunyai kecenderungan bermuatan negatif. Dengan demikian perlu dilakukan modifikasi terhadap permukaan zeolit agar bersifat lebih hidrofob dan bermuatan positif sehingga selektif dalam mengadsorpsi senyawa anionik organik non polar.

Modifikasi dengan surfaktan kationik CTAB (cetyltrimethylammonium Bromide) pada permukaan MCM-49 [10], pada MCM-41 via mikroemulsi [11], pada Na-monmorilonit [12] dan pada zeolit alam oleh [9, 13]. Sementara itu Taffarel dan Rubio [2] dalam modifikasi zeolit-CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) sebagai penyerap surfaktan anionik SDBS (Sodium Deodecyl Benzene Sulfonate) sedangkan Setiawati *dkk.* [14] sebagai penyerap fosfat.

Dalam penelitian ini dilakukan modifikasi zeolit alam menggunakan surfaktan kationik *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) dan menguji daya jerapnya sebagai adsorben senyawa organik surfaktan anionik Alkil Benzene Sulfonat (ABS) yang terkandung dalam detergen.

2. Metodologi Penelitian

Bahan: Zeolit alam Bayat (Klaten), akuades, akuademineral, CTAB (*Cetyltrimethylammonium*

Bromide), NH_4Cl , Alkil Benzene Sulfonat (ABS), AgNO_3 , metilen biru, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 p.a, CHCl_3 .

Alat: Peralatan gelas, *batch shaker*, sentrifugasi, ayakan ukuran 150 mesh, *oven*, *furnace*, spektrofotometer FTIR, spektrofotometer UV-Visible Shimadzu.

Prosedur Penelitian

Preparasi Zeolit Alam. Zeolit alam Bayat dicuci dengan aquades dan dikeringkan suhu 105°C selama 10 jam, kemudian diayak menggunakan ayakan lolos 150 mesh.

Pengaktifan. 30 gram zeolit direndam dalam 600 mL larutan NH_4Cl 1,5 M selama 12 jam dan diaduk 350 rpm pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dan dicuci dengan aquademineralisasi hingga filtrate menunjukkan pH netral (diperiksa dengan AgNO_3). Residu dikalsinasi suhu 350° C selama 9 jam. Hasil pengaktifan selanjutnya kita sebut H-Zeolit.

Modifikasi Zeolit Alam Teraktivasi Dengan Surfaktan CTAB. Sebanyak 21 gram zeolit dibagi kedalam tiga buah erlenmeyer dan ditambahkan CTAB dengan konsentrasi yaitu 0,25 mM, 1 mM, 100 mM (selanjutnya disebut ZMS-1, ZMS-2, dan ZMS-3). Campuran diaduk dalam *shaker* 150 rpm selama 24 jam, dicuci hingga filtrat tidak menunjukkan endapan putih AgBr (diperiksa dengan AgNO_3) dan residunya dikeringkan suhu 70° C selama 5 jam.

Karakterisasi Zeolit. H-Zeolit, ZMS-1, ZMS-2, dan ZMS-3 dikarakterisasi menggunakan instrument FTIR.

Pembuatan Larutan Standar ABS. Persiapan uji dilakukan dengan membuat larutan standar ABS berbagai variasi konsentrasi yaitu 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; dan 2,0 ppm melalui pengenceran larutan induk ABS 1000 ppm.

Analisis Konsentrasi ABS Melalui Metode MBAS (*Methylene Blue Active Substance*). 10 mL sampel ABS dimasukkan kedalam corong pisah lalu ditambahkan 2,5 mL larutan metilen biru (0,0125 g metilen biru : 12,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,7 mL H_2SO_4 : aquades hingga 250 mL dalam labu ukur), dan ditambahkan 5 mL kloroform, kemudian digojok dan dikeluarkan gasnya sebanyak 2 x 1,5 menit dan didiamkan sampai terbentuk dua fasa air di atas dan fasa kloroform di bawah. Fasa kloroform ditampung dicorong pisah lainnya, sedangkan fasa air di buang. Fasa kloroform ditambah dengan 5 mL larutan pencuci (12,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,7 mL H_2SO_4 : aquades hingga 250 mL dalam labu ukur) dan digojok kembali sambil dibuang gasnya selama 1,5 menit dan didiamkan. Lapisan bawah ditampung dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan sampai tanda tera dengan kloroform, sedangkan fasa atas dibuang. Larutan hasil pengenceran siap diuji dengan spektrofotometer UV-Vis.

Pengaruh Variasi Konsentrasi Larutan ABS. Sebanyak 0,1 g zeolit hasil modifikasi dicampurkan dengan 25 mL larutan ABS (Alkil Benzene Sulfonat) 50,

75, dan 100 ppm. Campuran selanjutnya diaduk dalam stirrer dengan kecepatan 150 rpm dengan waktu 60 menit. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit dan larutannya diuji dengan menggunakan metode MBAS dan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Pengaruh Variasi Waktu Kontak. Sebanyak 0,1 g zeolit hasil modifikasi dicampurkan dengan konsentrasi optimum alkil benzena sulfonat. Campuran selanjutnya diaduk dalam stirrer dengan kecepatan 150 rpm dengan variasi waktu 15, 30, 45, 60, 75, dan 90 menit. Kemudian disentrifugasi selama 10 menit dan larutannya diuji dengan menggunakan metode MBAS dan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

3. Hasil dan Pembahasan

Preparasi zeolit dilakukan untuk menghilangkan pengotor organik, memperbesar ukuran pori, dan memperluas permukaan. Proses ini dapat disebut pula aktivasi zeolit secara fisika. Hasilnya adalah butiran zeolit bebas pengotor organik dengan luas permukaan dan ukuran pori yang beragam sekitar 106 µm atau 150 mesh.

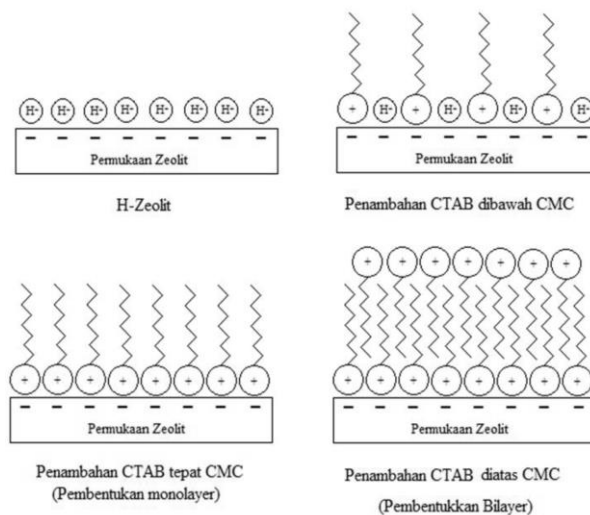
Aktivasi Zeolit

Aktivasi zeolit secara kimia dapat dilakukan dengan pengasaman yang menyebabkan terjadinya pertukaran kation penyeimbang dengan H⁺. Tujuan pengaktifan ini juga agar H⁺ dalam zeolit dapat bertukar dengan kation CTAB untuk keperluan proses modifikasi, karena H⁺ merupakan gugus pergi yang baik. Pertukaran kation pada zeolit menggunakan NH₄Cl pada temperatur ruang dapat menggantikan kation dengan NH₄⁺ sehingga didapatkan NH₄⁺-zeolit. Pengaktifan ini menurut tidak merusak struktur tetapi dapat lebih memurnikan zeolit dari pengotor-pengotornya. Pembentukan H-zeolit selanjutnya dilakukan secara termal yaitu pada suhu 3500 C, hal ini dilakukan agar NH₃ dapat terlepas dan menyisakan H⁺ yang berinteraksi elektrostatis dengan permukaan zeolit.

Modifikasi H-Zeolit Menggunakan Surfaktan CTAB

Modifikasi H-zeolit ini dilakukan melalui pertukaran kation menggunakan surfaktan kationik CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*) dengan harapan dapat mengubah sifat zeolit menjadi lebih hidrofob dan berkarakter parsial positif akibat permukaan zeolit yang terlapis molekul surfaktan dalam bentuk bilayer sehingga dapat mengikat anion. Menurut Taffarel dan Rubio [2], pada konsentrasi surfaktan rendah, kation surfaktan dapat dipertukarkan dengan kation penyeimbang dari zeolit alam sehingga akan terbentuk monolayer kation surfaktan pada permukaan eksternal zeolit. Pada konsentrasi yang lebih

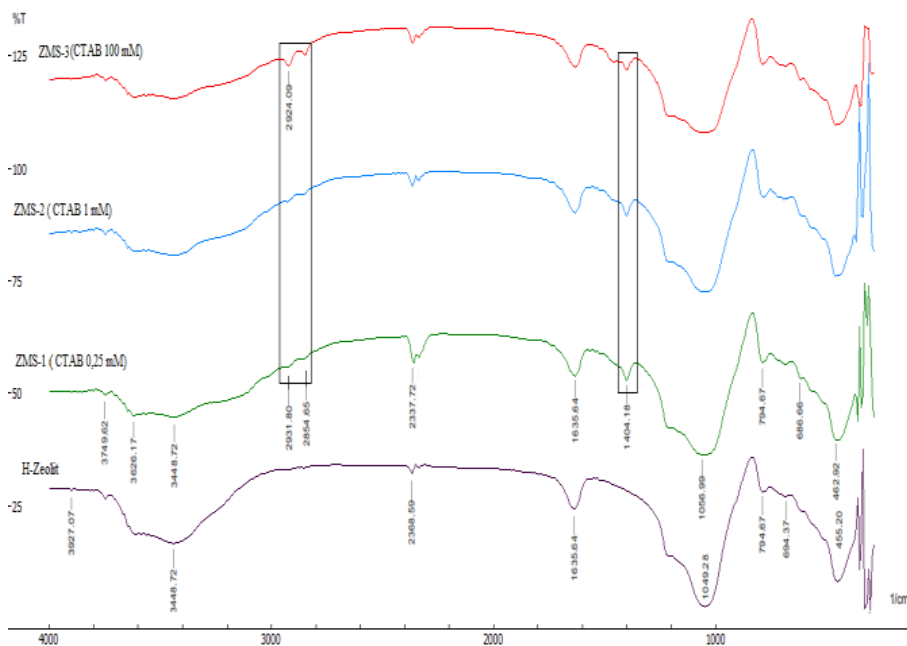
tinggi yaitu pada saat CMC (*Critical Micelles Concentration*) atau diatas CMC molekul surfaktan yang melekat dengan interaksi elektrostatis ke permukaan eksternal akan membentuk bilayer atau lebih, di mana lapisan luar molekul surfaktan terikat oleh interaksi hidrofobik. Ilustrasi interaksi ini terdapat pada Gambar 1. Muatan permukaan eksternal zeolit berubah dari negatif menjadi positif dan sekarang mempunyai kapasitas tukar anion.



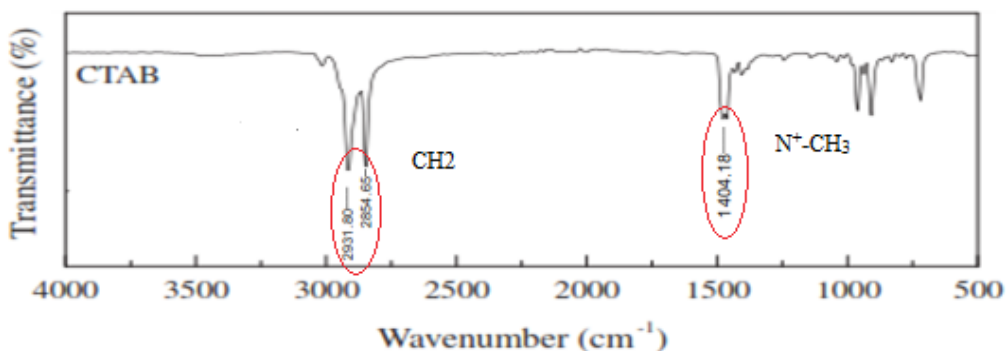
Gambar 1. Skema Konfigurasi CTAB pada permukaan zeolit

Spektra infra merah zeolit dapat diamati pada rentang bilangan gelombang 300- 1300 cm⁻¹ yang menginterpretasikan daerah utama serapan ikatan tetrahedral dari komponen utama penyusun zeolit yaitu SiO₄ dan AlO₄ [2]. Perbandingan hasil FTIR antara zeolit alam teraktivasi (H-Zeolit) dengan zeolit termodifikasi CTAB di bawah CMC, tepat CMC dan diatas CMC ditunjukkan dalam Gambar 2.

Spektra FTIR untuk zeolit alam teraktivasi dan zeolit termodifikasi CTAB membuktikan bahwa telah terjadi pertukaran kation H⁺ dengan kation CTA⁺ (Cetyltrimethylammonium) dari CTAB pada zeolit aktif, dengan membandingkan spektra surfaktan CTAB dari Taffarel dan Rubio [2] pada Gambar 3, yang menunjukkan ciri khas serapan kristal CTAB yakni pada panjang gelombang 2931,80 cm⁻¹ dan 2854,65 cm⁻¹ dimana pita serapan ini merupakan vibrasi asimetrik dan simetrik -CH₂ serta vibrasi ulur asimetrik dan simetrik pada terminal gugus metil dari trimetilammonium (CH₃-R).



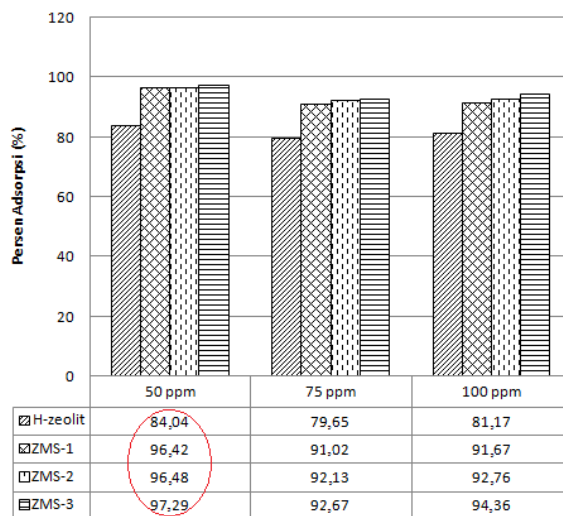
Gambar 2. Spektra FTIR (a) H-Zeolit, (b) ZMS-1, (c) ZMS-2, dan (d) ZMS-3



Gambar 3. Spektra FTIR kristal CTAB murni [2]

Pada spektra ZMS-3 terlihat puncak serapan pada bilangan gelombang $2931,80\text{ cm}^{-1}$ dan $2854,65\text{ cm}^{-1}$ semakin tajam, hal ini menegaskan jika surfaktan CTAB berhasil teradsorp ke permukaan zeolit karena menurut Hongping dkk. [15] pada konsentrasi CTAB yang tinggi, kisaran frekuensi berada pada bilangan gelombang yang lebih rendah karena pita absorpsi rentangan CH_2 asimetrik berada pada *all-trans conformation*. Namun, pada konsentrasi CTAB rendah, frekuensi bergeser secara signifikan pada bilangan gelombang yang lebih tinggi, yang mengindikasikan bahwa sejumlah besar rantai amina berada pada konformer *gauche*. Pada panjang gelombang $1404,18\text{ cm}^{-1}$ dalam spektra FTIR ZMS-1, ZMS-2, maupun ZMS-3 [16] memperkuat asumsi bahwa zeolit telah berhasil dimodifikasi dengan CTAB karena merupakan vibrasi $\text{N}-(\text{CH}_3)$ tekuk yang terdapat pada gugus aktif rantai surfaktan CTAB.

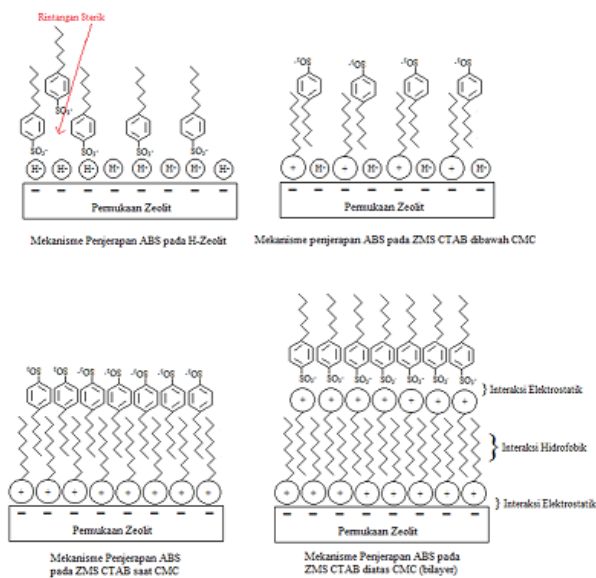
Pengaruh Variasi Konsentrasi Larutan ABS



Gambar 4. Hasil adsorpsi zeolit terhadap ABS berbagai konsentrasi

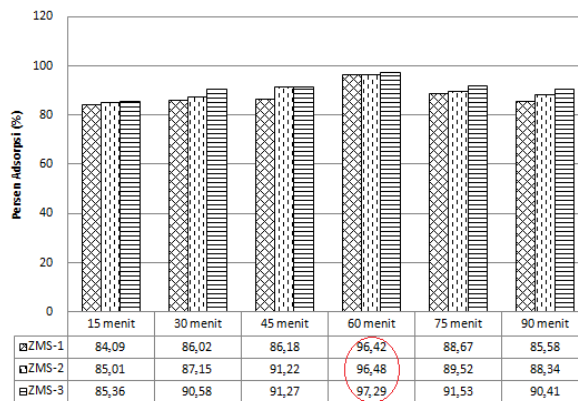
Pada gambar 4, konsentrasi ABS 50 ppm merupakan konsentrasi maksimum dalam

pengadsorpsian ABS oleh H-zeolit maupun zeolit temodifikasi surfaktan (ZMS), dan persen adsorpsi terbesar ditunjukkan oleh ZMS-3 yaitu sebesar 97,29 %. Hal ini membuktikan bahwa dipermukaan zeolit telah terjadi bilayer surfaktan CTAB yang menyebabkan performanya lebih baik dibandingkan H-zeolit, ZMS-1 atau ZMS-2. Terbentuknya bilayer pada ZMS-3 ini menyebabkan interaksi *van der waals* [2] antara muatan positif pada permukaan bilayer zeolit dengan muatan negatif dari surfaktan anion ABS, sehingga penjerapannya terhadap ABS lebih maksimal. Kemampuan adsorpsi ZMS-2 lebih baik dibandingkan ZMS-1, hal ini wajar terjadi sebab pada saat penambahan CTAB di bawah CMC permukaan zeolit masih belum berinteraksi sempurna dengan CTAB. Namun, untuk kondisi ZMS-2 dimungkinkan seluruh permukaan zeolit telah tertutupi oleh rantai metil dari CTAB yang menyebabkan interaksi hidrofobik antara permukaan monolayer zeolit dengan ABS. Adsorpsi dapat pula terjadi pada H-zeolit, walaupun performanya tidak lebih baik dibandingkan dengan adsorpsi oleh ZMS-1, ZMS-2 dan ZMS-3, hal ini dikarenakan pada saat adsorpsi ABS dengan H-zeolit, terjadi interaksi elektrostatis antara muatan positif dari permukaan zeolit (H^+) dengan muatan negatif dari anionik ABS (SO_3^-), mengakibatkan H-zeolit mampu mengadsorpsi surfaktan ABS. Gambar 5, merupakan perkiraan skema kejadian saat adsorpsi surfaktan ABS dengan H-Zeolit dan ZMS berbagai variasi konsentrasi CTAB berdasarkan CMC-nya yang mengacu pada penelitian Taffarel dan Rubio [2] dan Chutia *dkk.* [13].



Gambar 5. Mekanisme penjerapan ABS

Pengaruh Parameter Waktu Kontak



Gambar 6. Hasil adsorpsi terhadap 25 mL larutan ABS 50 ppm dengan variasi waktu kontak

Pada Gambar 6, waktu optimum untuk adsorpsi ABS oleh zeolit termodifikasi surfaktan adalah 60 menit, dimana waktu ini menunjukkan persen adsorpsi terbesar yaitu 96,42 % untuk ZMS-1, 96,48 % untuk ZMS-2, dan 97,29% untuk ZMS-3. Hal ini menjelaskan dalam waktu 60 menit telah terjadi kesetimbangan antara adsorben zeolit termodifikasi CTAB dengan adsorbat ABS. Namun pada saat setelah kondisi optimum terjadi penurunan kemampuan adsorpsi, hal ini dapat terjadi karena proses adsorpsi ini merupakan adsorpsi fisika yang dapat membuat senyawa ABS terlepas kembali kedalam larutan dengan adanya pengadukan yang terlalu lama.

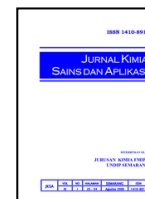
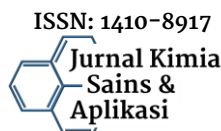
4. Kesimpulan

Zeolit alam yang sudah teraktivasi NH_4Cl telah berhasil dimodifikasi dengan surfaktan CTAB (*Cetiltrimethylammonium Bromida*). Daya jerap paling tinggi diperlihatkan oleh ZMS-3 yaitu zeolit termodifikasi CTAB dengan konsentrasi 100 mM (di atas CMC) sebesar 97,29% pada konsentrasi ABS 50 ppm dengan waktu kontak 60 menit.

5. Daftar Pustaka

- [1] Roberto Leyva-Ramos, Effect of temperature and ph on the adsorption of an anionic detergent on activated carbon, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 45, 3, (1989) 231-240 [10.1002/jctb.280450308](http://dx.doi.org/10.1002/jctb.280450308)
- [2] Silvio R. Taffarel, Jorge Rubio, Adsorption of sodium dodecyl benzene sulfonate from aqueous solution using a modified natural zeolite with CTAB, *Minerals Engineering*, 23, 10, (2010) 771-779 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2010.05.018>
- [3] Zhuo Guan, Xiang-Yu Tang, Taku Nishimura, Yu-Ming Huang, Brian J. Reid, Adsorption of linear alkylbenzene sulfonates on carboxyl modified multi-walled carbon nanotubes, *Journal of Hazardous Materials*, 322, (2017) 205-214 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.02.067>
- [4] Maulidah, Studi adsorpsi ABS (Alkyl Benzene Sulphonate) dari limbah rumah tangga Desa Ngadirgo menggunakan arang tempurung kelapa

- (coconut shells), in: Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Walisongo, Semarang, 2015.
- 71, 4, (2008) 1525-1534
<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2008.05.015>
- [5] Selli Renata Sari, Kajian Adsorpsi Linear Alkilbenzena Sulfonat (Las) Menggunakan Magnetit, in: Jurusan Kimia, Universitas Negeri Semarang, Semarang, 2015.
- [6] Housheng Xia, Chun-Hui Zhou, Dongshen Tong, Junjun Chen, Weihua Yu, Shaomin Liu, Preparation and catalysis in epoxidation of allyl chloride of zeolitic titanosilicate-1/smectitic clay minerals, *Applied Clay Science*, 53, 2, (2011) 279-287
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2011.04.014>
- [7] Di Zhang, Chun-Hui Zhou, Chun-Xiang Lin, Dong-Shen Tong, Wei-Hua Yu, Synthesis of clay minerals, *Applied Clay Science*, 50, 1, (2010) 1-11
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2010.06.019>
- [8] Chun Hui Zhou, An overview on strategies towards clay-based designer catalysts for green and sustainable catalysis, *Applied Clay Science*, 53, 2, (2011) 87-96
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2011.04.016>
- [9] Sriatun, Dimas Buntarto, Adi Darmawan, Pengaruh Penambahan Surfaktan Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) pada Zeolit Alam Terdealuminasi terhadap Kemampuan Mengadsorpsi Fenol, *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 11, 1, (2008) 20-24
- [10] Huijuan Wei, Sujuan Xie, Kefeng Liu, Wenjie Xin, Xiujie Li, Shanhe Liu, Shunming Gu, Shenglin Liu, Longya Xu, CTAB modification of MCM-49 zeolite containing HMI and its acylation of anisole, *Chinese Journal of Catalysis*, 36, 10, (2015) 1766-1776
[http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067\(15\)60887-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2067(15)60887-7)
- [11] Jailson A. Araújo, Fernanda T. Cruz, Ivana H. Cruz, Dilson Cardoso, Encapsulation of polymers in CTA-MCM-41 via microemulsion, *Microporous and Mesoporous Materials*, 180, (2013) 14-21
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.05.010>
- [12] Ahmet Gürses, Kübra Güneş, Ferda Mindivan, Mehtap Ejder Korucu, Metin Açıkyıldız, Çetin Doğar, The investigation of electrokinetic behaviour of micro-particles produced by CTA⁺ ions and Na-montmorillonite, *Applied Surface Science*, 318, (2014) 79-84
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.036>
- [13] Pratap Chutia, Shigeru Kato, Toshinori Kojima, Shigeo Satokawa, Adsorption of As(V) on surfactant-modified natural zeolites, *Journal of Hazardous Materials*, 162, 1, (2009) 204-211
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.024>
- [14] Dita Setiawati, Lia Destiarti, Nelly Wahyuni, Pemanfaatan Zeolit A Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) Sebagai Adsorben Fosfat, *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4, 2, (2015)
- [15] He Hongping, Frost L. Ray, Zhu Jianxi, Infrared study of HDTMA⁺ intercalated montmorillonite, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60, 12, (2004) 2853-2859
<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2003.09.028>
- [16] Zhaohui Li, Wei-Teh Jiang, Hanlie Hong, An FTIR investigation of hexadecyltrimethylammonium intercalation into rectorite, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*,



Sintesis dan Karakterisasi Zeolit Y

Sriatun^{a,*}, Taslimah^a, Erwin Nur Cahyo^a, Fuguh Devi Saputro^a

^a Inorganic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: sriatun@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords:</p> <p>Zeolite Y, cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), polyethylen glycol-400 (PEG-400)</p>	<p>Zeolite Y has been performed with concentration and type of surfactant studies these are cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and Polyethylene Glycol-400 (PEG-400) surfactants. The main raw material for synthesized zeolite Y is sol silica and aluminum hydroxide. Synthesis of zeolite Y using hydrothermal method with time of crystallization 24 hours and 72 hours at temperature 100°C. The process of calcining the product at temperature of 500°C for 5 hours. Analysis of zeolite products using Fourier Transform-Infra Red (FT-IR) and X-Ray Diffractometer (XRD). The results obtained that the zeolite synthesized with 24 hours hydrothermal time produced zeolite A, meanwhile the 72 hours produced Zeolite Y. The variation of concentration and the type of surfactant did not significantly affect the crystallinity and size of the resulting zeolite crystal grain. However, the use of surfactants increases the size of the zeolite crystal grains. The largest crystal grain size obtained at 24 hours zeolite using PEG-400 surfactant with a concentration of 6.25×10^{-5} M resulted in a crystal grain size of 46.82 nm.</p>
<p>Kata kunci:</p> <p>zeolit Y, cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), Polyethylen Glycol-400 (PEG-400)</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan pembuatan zeolit Y dengan kajian konsentrasi dan jenis surfaktan yaitu cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) dan Polyethylen Glycol-400 (PEG-400). Adapun bahan baku utama untuk membuat zeolit Y adalah sol silika dan alumunium hidroksida. Sintesis zeolit Y menggunakan metode hidrotermal dengan waktu kristalisasi 24 jam dan 72 jam pada suhu 100°C. Proses kalsinasi produk pada suhu 500°C selama 5 jam. Analisis produk zeolit menggunakan Fourier Transform-Infra Red (FT-IR) dan X-Ray Diffractometer (XRD). Hasil yang diperoleh bahwa zeolit yang disintesis dengan waktu hidrotermal 24 jam menghasilkan zeolit A sedangkan yang 72 jam menghasilkan Zeolit Y. Variasi konsentrasi dan jenis surfaktan tidak signifikan mempengaruhi kristalinitas dan ukuran bulir kristal zeolit yang dihasilkan. Namun penggunaan surfaktan meningkatkan ukuran bulir kristal zeolit. Ukuran bulir kristal terbesar didapatkan pada zeolit 24 jam yang menggunakan surfaktan PEG-400 dengan konsentrasi $6,25 \times 10^{-5}$ M menghasilkan ukuran bulir kristal 46,82 nm.</p>

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan wilayah dengan rangkaian gunung api mulai dari Sumatera, Jawa, Nusatenggara dan Sulawesi. Tuf merupakan salah satu produk gunung api setelah mengalami diagenesis menjadi zeolit sehingga Indonesia berpotensi besar menghasilkan zeolit. Sebaran zeolit terdapat di Lampung, Jawa Barat,

Jawa Tengah, Jawa Timur, Nusa Tenggara Timur, dan Sulawesi [1]. Zeolit adalah kristal mikropori aluminosilikat dengan berbagai struktur yang mengandung sifat intrinsik dari keasaman kuat, luas permukaan tinggi, stabilitas termal yang tinggi, dan selektivitas bentuk, menyebabkan zeolit diaplikasi secara ekstensif sebagai katalis di bidang proses

petrokimia [2, 3]. Karena pemanfaatan zeolit sangat luas maka eksplorasi terhadap zeolit alam terus dilakukan sehingga menyebabkan semakin berkurangnya deposit mineral zeolit. Sebagai mineral alam zeolit merupakan bahan *unrenewable* sehingga semakin lama akan habis. Oleh karena itu diupayakan untuk membuat zeolit tiruan/sintetik.

Salah satu zeolit sintetik yang banyak dikembangkan adalah zeolit Y. Zeolit ini merupakan mineral Faujasit dengan rasio Si/Al 1-3 [4], mempunyai stabilitas termal tinggi sehingga sesuai diaplikasikan pada proses yang memerlukan suhu tinggi seperti pada proses perengkahan katalitik cair (FCC). Namun zeolit ini mempunyai struktur mikropori sehingga mempunyai keterbatasan dalam mendifusikan dan mentransportasikan massa dari dan ke situs aktif. Kondisi ini dapat menyebabkan polimerisasi produk atau reaksi intermediat sehingga dapat memblokir situs aktif dalam kerangka zeolit ataupun menutup pori sehingga *lifetime* katalis Zeolit Y menjadi pendek [5]. Berbagai strategi telah dikembangkan untuk membuat zeolit hirarkis. Salah satunya adalah pembuatan zeolit mesopori menggunakan templat/agen pengarah/pencetak pori [6-8]. Liu *dkk.* [6] menyatakan bahwa surfaktan organosilan ($[(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiC}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{16}\text{H}_{37}]\text{Cl}$, TPHAC) terdispersi dengan sangat baik dalam *water glass* (sol silika) menghasilkan zeolit Y dengan struktur mesopori.

Templat surfaktan kationik berbasis amonium dapat juga digunakan sebagai agen pengarah pada sintesis zeolit berbagai tipe menggunakan surfaktan amonium pada sintesis MCM-41 dan zeolit Y [9] dan menggunakan PTMOH pada sintesis zeolit Y [10]. Hasan *dkk.* [11] melakukan sintesis zeolit A dengan penambahan surfaktan kationik berbasis amonium yaitu cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) sebagai agen pencetak pori. Produk sintesis menunjukkan ukuran mesopori yaitu sekitar 11,5-11,7 nm, penggunaan surfaktan meningkatkan kristalinitas zeolit. Templat surfaktan non ionik juga telah digunakan pada sintesis zeolit MTT [12]. Wang *dkk.* [13] mensintesis nano-zeolit IM-5 dengan templat PEG (polietilen glikol) dan CTAB secara hidrotermal suhu 170°C selama 6-14 hari dan suhu kalsinasi sebesar 550°C selama 6 jam. Produk zeolit IM-5 berukuran nano yaitu sekitar 35 nm.

Dalam penelitian ini dilakukan sintesis zeolit Y menggunakan templat surfaktan kationik cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) dan non ionik polyethylen Glycol (PEG) serta waktu hidrotermal yang berbeda untuk mengetahui pengaruh penambahan jenis surfaktan terhadap karakter zeolit yang dihasilkan.

2. Metode Penelitian

Bahan

Natrium silikat solution (Merck), Aluminium hidroksida powder (Merck), NaOH pelet (Merck), akuades, akuademineral, cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB) powder (Merck) dan Polyethylen Glycol-400 (PEG-400) solution (Merck).

Preparasi Larutan Natrium Aluminat

Pembuatan natrium aluminat diawali dengan melarutkan 20 g NaOH yang dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, selanjutnya ke dalam larutan tersebut dimasukkan sebanyak 8,5 g $\text{Al}(\text{OH})_3$ sedikit demi sedikit dan dilakukan pengadukan disertai pemanasan pada suhu 100 °C sampai homogen.

Preparasi Larutan Surfaktan

Serbuk CTAB dengan berat tertentu dilarutkan dalam 25 mL akuades hingga homogen untuk mendapatkan larutan CTAB dengan konsentrasi 0,125 M, 0,25 M, dan 0,5 M. Larutan PEG-400 pada volume tertentu ditambah 100 mL akuades untuk mendapatkan konsentrasi PEG $6,25 \times 10^{-5}$ M, $1,25 \times 10^{-4}$ M, dan $6,25 \times 10^{-4}$ M.

Sintesis Zeolit Y

Sejumlah surfaktan CTAB ditambah natrium silikat disertai dengan pengadukan sampai homogen, kemudian ditambahkan natrium aluminat, perbandingan natrium silikat:natrium aluminat 1:1, pengadukan dilakukan sampai terbentuk gel berwarna putih. Selanjutnya dipindahkan dalam wadah teflon, dipanaskan pada suhu 100°C selama 24 jam dalam oven. Padatan hasil disaring, dicuci sampai pH netral, dan dikeringkan pada suhu 100°C selama 2 jam. Langkah terakhir adalah kalsinasi pada suhu 500°C selama 5 jam. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk waktu hidrotermal/pemanasan selama 72 jam. Selanjutnya prosedur sintesis tersebut juga dilakukan dengan menggunakan surfaktan PEG-400. Penetapan kode sampel terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Penetapan kode sampel

Keterangan	Waktu hidrotermal	
	24	72
Zeolit tanpa penambahan Surfaktan	ZTS	Z-Y0
Zeolit dengan penambahan CTAB 0,125 M	ZC1	Z-YC1
Zeolit dengan penambahan CTAB 0,25 M	ZC2	Z-YC2
Zeolit dengan penambahan CTAB 0,5 M	ZC3	Z-YC3
Zeolit dengan penambahan PEG $6,25 \times 10^{-5}$ M	ZP1	Z-YP1
Zeolit dengan penambahan PEG $1,25 \times 10^{-4}$ M	ZP2	Z-YP2
Zeolit dengan penambahan PEG $6,25 \times 10^{-4}$ M	ZP3	Z-YP3

Karakterisasi Zeolit

Karakterisasi zeolit dilakukan dengan menggunakan instrument Fourier Transform-Infra Red Spectroscopy (FT-IR) dan X Ray Diffraction (XRD).

3. Hasil dan Pembahasan

Sintesis Zeolit

Sintesis zeolit dilakukan dengan cara mereaksikan natrium silikat dan natrium aluminat, ketika natrium aluminat dicampurkan sedikit demi sedikit ke dalam larutan natrium silikat, larutan berubah menjadi putih. Hal tersebut dikarenakan silanol yang berasal dari natrium silikat bereaksi dengan natrium aluminat melalui reaksi polimerisasi membentuk zeolit [14]. Jika sebelum direaksikan dengan natrium aluminat, natrium silikat ditambah dengan surfaktan maka proses polimerisasi zeolit akan diarahkan oleh surfaktan, sehingga terbentuk pori dengan ukuran yang diinginkan sesuai dengan surfaktan yang digunakan. Ukuran kemruahan gugus surfaktan sebagai bagian hidrofilik serta panjangnya rantai hidrofobik surfaktan sangat menentukan besarnya ukuran surfaktan saat membentuk misel.

Surfaktan Cetyltrimethylammonium Bromide $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br]$ merupakan salah satu jenis surfaktan kationik dan sering disebut sebagai *strongly structure directing*. Karena kation CTA^+ dapat berinteraksi cepat dengan anion silikat dan aluminat dengan kuat yang tetap bertahan dalam struktur zeolit sampai kristalisasi selesai. Surfaktan CTAB akan saling berinteraksi membentuk misel menyebabkan gugus hidrofobik (ekor) dari surfaktan CTAB akan berkumpul. Gugus hidrofilik (kepala) dari surfaktan CTAB akan menjauhi gugus hidrofobik. Secara elektrostatik gugus hidrofilik (kepala surfaktan) akan berinteraksi dengan unit pembangun primer dari zeolit (*primary building unit*) dari TO_4 . Satuan bangun primer struktur zeolit adalah suatu tetrahedral terdiri atas atom pusat Si dan Al yang dikelilingi oleh empat atom oksigen, yaitu $[SiO_4]_4^-$ atau $[AlO_4]_5^-$ [15]. Polimerisasi zeolit akan membentuk kerangka dan kerangka dari zeolit tersebut akan diarahkan sesuai dengan misel yang terbentuk dari adanya surfaktan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hasan *dkk.* [11] pada tahap awal ion-ion zeolit akan mengalami polimerisasi, kemudian partikel zeolit berukuran kecil akan terbentuk dan terpasang di sepanjang misel surfaktan CTAB. Surfaktan non ionik PEG-400 adalah polietilenglikol $H(O-CH_2-CH_2)_n OH$ dengan harga n antara 8,2 dan 9,1. Dengan demikian hampir sama dengan CTAB, namun surfaktan ini non ionik. Oleh karena itu kemungkinan interaksi dengan anion silikat dan aluminat tidak sekuat pada CTAB.

Kecenderungan terbentuknya misel pada CTAB lebih mudah karena pada strukturnya terdapat polarisasi antara gugus polar (hidrofilik) dan non polar (hidrofobik), sedangkan pada PEG-400 tidak karena PEG tersusun dari monomer-monomer oksietilen. Dengan demikian perkiraan mekanisme yang mungkin terjadi antara ion-ion penyusun zeolit dengan PEG-400 adalah sebagai berikut:

Mekanisme surfaktan PEG-400 membentuk cincin

Surfaktan PEG-400 merupakan surfaktan nonionik diduga membentuk cincin yang besar dengan kedua pangkal ujung saling bertemu sehingga terbentuk misel.

Interaksi antara zeolit dengan PEG-400 diduga adalah gaya Van Der Waals. Ion-ion penyusun zeolit akan mengelilingi molekul PEG-400 karena adanya gaya tarik menarik listrik yang relatif lemah. Walaupun lemah, gaya van der Waals memiliki pengaruh yang nyata terhadap sifat fisik dan termal suatu molekul. Peranan gaya Van Der Waals yang penting hanya dalam menjelaskan interaksi antara molekul. Dan pada saat kalsinasi nantinya PEG-400 akan terdekomposisi menjadi gas etilena dan H_2O , sehingga PEG-400 akan terlepas dari struktur Kristal.

Mekanisme surfaktan PEG-400 membentuk misel

Mekanisme ini, diduga surfaktan PEG-400 dapat membentuk misel dengan cara gugus hidrofilik pada PEG-400 yang berupa gugus oksietilena (CH_2-CH_2-O) berinteraksi dengan air dan gugus hidrofobiknya menjauhi gugus hidrofilik sehingga akan terbentuk sebuah lingkaran berupa misel. Pada permukaan zeolit yang bermuatan negatif, atom oksigen pada gugus oksietilena dapat berinteraksi elektrostatik dengan situs negatif di permukaan zeolit dengan mengambil proton dari air dan memperoleh muatan positif [16].

Mekanisme surfaktan PEG-400 tetap utuh sebagai molekul yang memanjang

Mekanisme ini, diduga molekul surfaktan membentuk molekul yang berkelok-kelok karena antar ujung surfaktan tidak saling bertemu. Sehingga kerangka dari zeolit ini berada di sekeliling rantai surfaktan yang memanjang.

Sintesis zeolit dilakukan pada pH 12-14, karena pada pH basa ini dalam larutan terbentuk anion $Al(OH)_4^-$ atau AlO_2^- yang merupakan anion pembentuk zeolit yang berasal sumber alumina. Hal ini akan berbeda jika larutan dalam keadaan asam yaitu pada pH 1 sampai 4 karena senyawa Al yang dominan adalah $[Al(H_2O)_6]^{3+}$. Keberadaan kation tersebut akan menghambat pembentukan kerangka aluminosilikat dari zeolit. Kerangka zeolit juga dipengaruhi oleh keberadaan anion dari silikat. Pada pH > 12, akan terbentuk ion $Si(OH)_4$, yang merupakan ion utama dalam pembentukan kerangka zeolit [17]. Ion-ion silikat dan aluminat merupakan monomer pembentuk kerangka zeolit. Ketika natrium silikat direaksikan dengan surfaktan kemudian ditambah larutan natrium aluminat, maka monomer-monomer penyusun kerangka zeolit (ion silikat dan aluminat) akan mengalami proses polimerisasi kondensasi membentuk kerangka yang diarahkan oleh misel dari surfaktan. Polimerisasi pada sintesis zeolit ditandai dengan terbentuknya gel, selanjutnya terbentuk inti kristal. Pada proses hidrotermal merupakan proses kristalisasi yaitu penataan atom-atom agar diperoleh struktur teratur/kristal yang stabil. Tahap ini menentukan tipe zeolit. Lamanya waktu dan suhu kristalisasi akan mempengaruhi hasil penataan tersebut. Dalam penelitian ini digunakan waktu 24 jam dan 72 jam dan suhu 100°C.

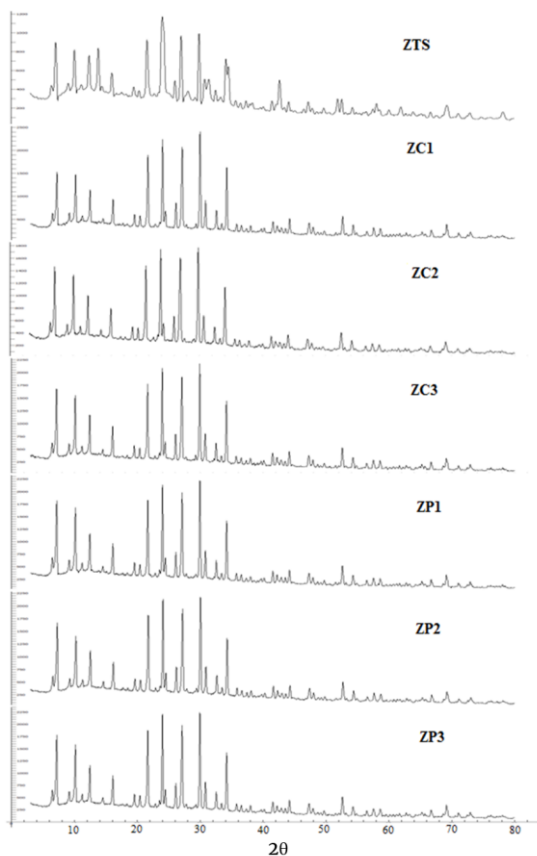
Proses kalsinasi pada suhu 500°C selama 5 jam bertujuan untuk mendekomposisi surfaktan baik CTAB maupun PEG-400 sehingga meninggalkan pori yang

besar. Dekomposisi sempurna CTAB melepaskan gas CO₂ dan H₂O, sedangkan pada PEG-400 melepaskan gas etilen dan H₂O.

Karakterisasi produk dengan X-Ray Diffraction (XRD)

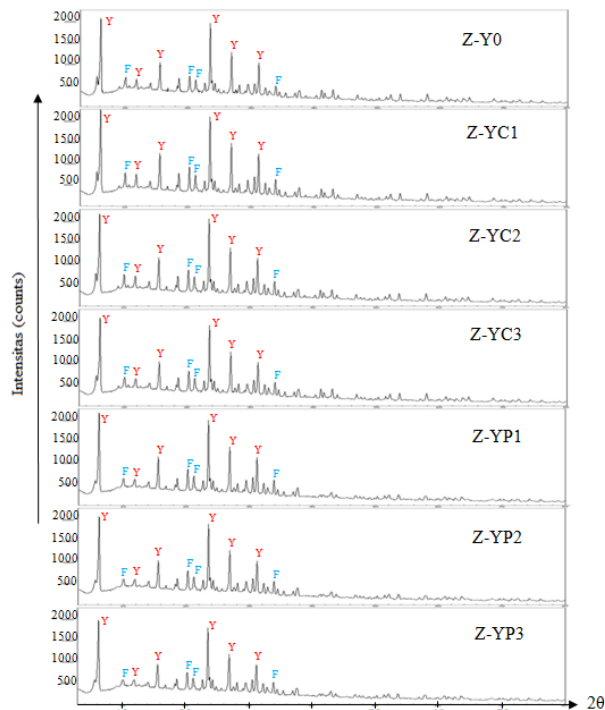
Difraktogram suatu senyawa/materi dapat memberikan gambaran kristalinitasnya. Difraktogram yang memiliki pola pemisahan puncak yang jelas intensitas dan ketajaman puncaknya tinggi memiliki kristalinitas yang baik. Berdasarkan hasil analisis pola difraktogram terlihat adanya perbedaan yang signifikan dari ketajaman puncak zeolit tanpa penambahan surfaktan dengan zeolit yang menggunakan surfaktan. Adanya puncak 2θ yang muncul di tempat yang hampir sama tersebut menandakan bahwa zeolit hasil sintesis mempunyai jenis mineral yang sama satu sama lain. Gambar 1 menunjukkan ketajaman puncak dari zeolit yang disintesis dengan variasi konsentrasi dan jenis surfaktan mempunyai intensitas ketajaman puncak yang hampir sama, hal ini diduga zeolit yang terbentuk mempunyai kristalinitas yang sama.

Selanjutnya data difraktogram dari produk hasil sintesis dibandingkan dengan database mineral menggunakan program JCPDS. Menurut [18] identifikasi mineral dilakukan dengan cara membandingkan difraktogram zeolit dengan database Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). Pola difraktogram zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 24 jam terdapat pada Gambar 1. Gambar tersebut sesuai dengan data pada JCPDS No. 39-0222 sehingga bisa dikatakan zeolit ini merupakan zeolit A.



Gambar 1. Difraktogram XRD zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 24 jam

Pola difraktogram zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 72 jam terdapat pada Gambar 2. Gambar tersebut sesuai dengan data pada JCPDS No. 38-0240 di mana zeolit Y memiliki puncak difraktogram 2θ sekitar 6,181°, 15,601°, 23,535°, 26,936°, dan 31,274° sehingga bisa dikatakan zeolit hasil sintesis ini merupakan zeolit Y.



Gambar 2. Difraktogram XRD zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 72 jam

Dari data XRD tersebut dapat ditentukan ukuran bulir Kristal pada zeolit hasil sintesis dengan menggunakan persamaan Scherrer, yang hasilnya ditunjukkan dalam Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2: Tabel ukuran bulir kristal dari zeolit yang dihasilkan

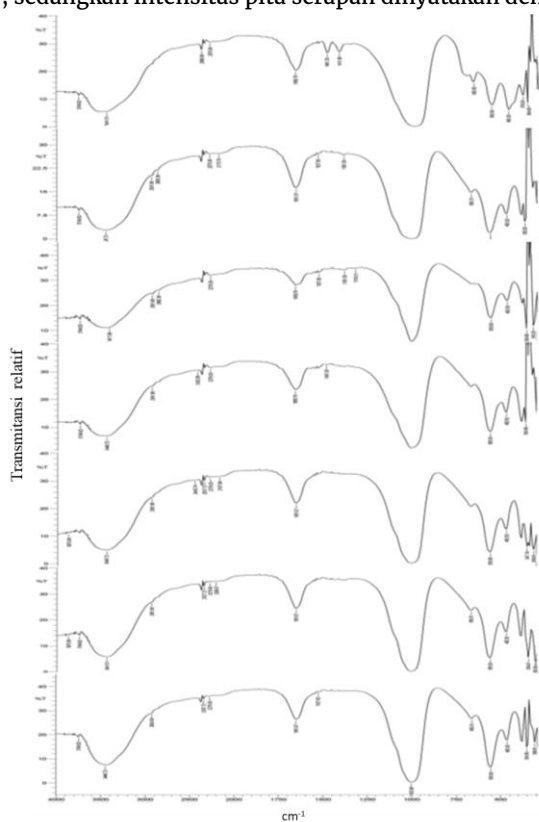
Sampel	Ukuran Bulir Kristal (nm)	Sampel	Ukuran Bulir Kristal (nm)
ZTS	22,01	Z-Y0	15,93
ZC1	42,46	Z-YC1	42,60
ZC2	40,45	Z-YC2	44,30
ZC3	46,43	Z-YC3	45,00
ZP1	46,82	Z-YP1	44,34
ZP2	44,93	Z-YP2	45,39
ZP3	46,47	Z-YP3	45,73

Berdasarkan data Tabel 2 terlihat adanya perbedaan ukuran bulir kristal yang sangat signifikan dari zeolit tanpa penambahan surfaktan dengan zeolit yang menggunakan surfaktan, dengan demikian adanya penambahan surfaktan ini akan meningkatkan ukuran bulir kristal yang terbentuk. Tetapi adanya variasi konsentrasi dan jenis surfaktan yang berbeda tidak mempengaruhi ukuran bulir Kristal.

Konsentrasi maksimum surfaktan yang menghasilkan ukuran bulir Kristal yang besar adalah zeolit yang menggunakan surfaktan PEG-400 dengan konsentrasi $6,25 \times 10^{-5}$ M menghasilkan ukuran bulir Kristal yang paling besar yaitu 46,82 nm. Kemungkinan karena kerangka dari zeolit yang terbentuk tersusun menyebar di sepanjang rantai panjang dari surfaktan PEG-400 sehingga dapat meningkatkan ukuran bulir Kristal.

Karakterisasi produk dengan *Fourier Transform Infrared* (FT-IR)

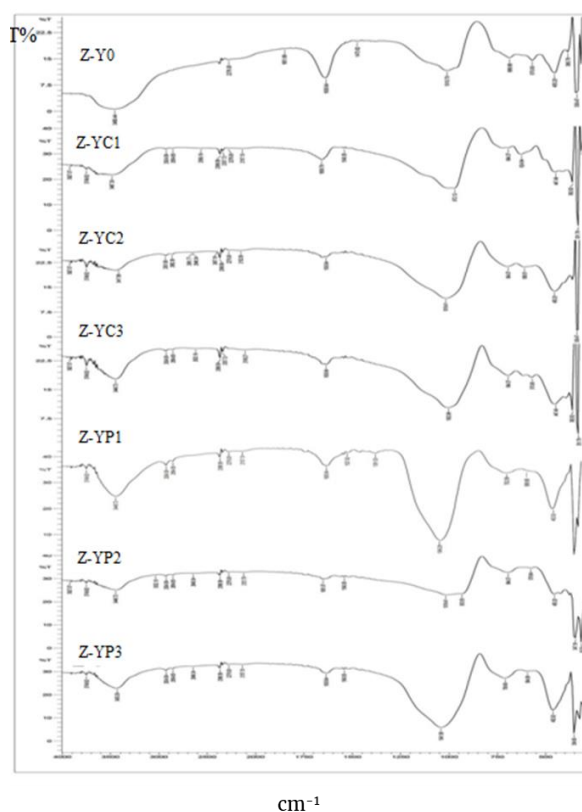
Karakterisasi produk dengan menggunakan FTIR bertujuan untuk mengidentifikasi gugus fungsi penyusun kerangka zeolit. Spektra yang dihasilkan berupa pita-pita serapan, letak pita serapan dalam spektra IR dinyatakan dengan bilangan gelombang (cm^{-1}), sedangkan intensitas pita serapan dinyatakan dengan



Gambar 3. Spektra FTIR zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 24 jam

Spektra yang dihasilkan oleh zeolit yang menggunakan surfaktan CTAB maupun PEG-400 memiliki kesamaan pola dengan zeolit yang disintesis tanpa menggunakan surfaktan. Hal ini menunjukkan bahwa surfaktan yang digunakan sebagai templat pada zeolit tidak mengubah struktur asli dari zeolitnya. Pita-pita serapan yang muncul pada zeolit hasil sintesis ini nilainya berdekatan atau hampir sama dengan pita-pita serapan karakteristik yang dimiliki oleh zeolit A maupun zeolit Y standar.

persen transmitansi (%T). Analisis FTIR dilakukan mulai dari bilangan gelombang $4000-300 \text{ cm}^{-1}$ pada rentang bilangan gelombang tersebut terdapat gugus-gugus fungsi serta sidik jari yang dimiliki oleh zeolit. Pita serapan karakteristik untuk zeolit A di tunjukkan oleh beberapa bilangan gelombang sebagai berikut, pada bilangan gelombang $420-300 \text{ cm}^{-1}$ merupakan pore opening, bilangan gelombang $500-420 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi tekuk T-O, pada bilangan gelombang $900-1250 \text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi ulur asimetris O-T-O, bilangan gelombang $650-850 \text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi ulur simetris O-T-O, dan bilangan gelombang $500-650 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi *double ring* (D_4R) yang merupakan pita serapan khas yang menunjukkan telah terbentuknya zeolit A [17]. Gambar 3 berikut merupakan spektra dari zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 24 jam.



Gambar 4. Spektra FTIR zeolit hasil sintesis dengan waktu hidrotermal 72 jam

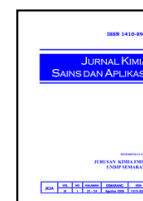
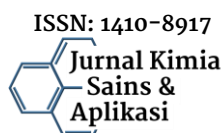
4. Kesimpulan

Sintesis zeolit baik menggunakan surfaktan ataupun tanpa menggunakan surfaktan dengan dengan waktu hidrotermal 24 jam menghasilkan zeolit A, namun dengan waktu hidrotermal 72 jam dapat menghasilkan zeolit Y. Variasi jenis dan konsentrasi surfaktan tidak mempengaruhi kristalinitas dan tipe zeolit. Variasi jenis surfaktan tidak terlalu berpengaruh berpengaruh pada ukuran bulir kristal, namun penggunaan surfaktan akan meningkatkan ukuran bulir kristal. Ukuran bulir kristal optimum didapatkan pada zeolit yang menggunakan surfaktan PEG-400 dengan

konsentrasi $6,25 \times 10^{-5}$ M menghasilkan ukuran bulir kristal 46,82 nm.

5. Daftar Pustaka

- [1] Kusdarto, Potensi Zeolit di Indonesia, *Jurnal Zeolit Indonesia*, 7, 2, (2008) 78-87
- [2] Martin Hartmann, Albert Gonche Machoke, Wilhelm Schwieger, Catalytic test reactions for the evaluation of hierarchical zeolites, *Chemical Society Reviews*, 45, 12, (2016) 3313-3330 <http://dx.doi.org/10.1039/C5CS00935A>
- [3] Ying Wei, Tanja E Parmentier, Krijn P de Jong, Jovana Zečević, Tailoring and visualizing the pore architecture of hierarchical zeolites, *Chemical Society Reviews*, 44, 20, (2015) 7234-7261 <https://dx.doi.org/10.1039/C5CS00155B>
- [4] Zhenzhuo Wang, Izumi Kumakiri, Kazuhiro Tanaka, Xiangshu Chen, Hidetoshi Kita, NaY zeolite membranes with high performance prepared by a variable-temperature synthesis, *Microporous and Mesoporous Materials*, 182, (2013) 250-258 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.05.002>
- [5] Kyungsu Na, Minkee Choi, Ryong Ryoo, Recent advances in the synthesis of hierarchically nanoporous zeolites, *Microporous and Mesoporous Materials*, 166, (2013) 3-19 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.03.054>
- [6] Baoyu Liu, Kaihong Xie, Su Cheun Oh, Dalei Sun, Yanxiong Fang, Hongxia Xi, Direct synthesis of hierarchical USY zeolite for retardation of catalyst deactivation, *Chemical Engineering Science*, 153, (2016) 374-381 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.07.041>
- [7] Feng-Shou Xiao, Lifeng Wang, Chengyang Yin, Kaifeng Lin, Yan Di, Jixue Li, Ruren Xu, Dang Sheng Su, Robert Schlögl, Toshiyuki Yokoi, Takashi Tatsumi, Catalytic Properties of Hierarchical Mesoporous Zeolites Templated with a Mixture of Small Organic Ammonium Salts and Mesoscale Cationic Polymers, *Angewandte Chemie*, 118, 19, (2006) 3162-3165 [10.1002/ange.200600241](https://doi.org/10.1002/ange.200600241)
- [8] Jian Zhou, Zile Hua, Zhicheng Liu, Wei Wu, Yan Zhu, Jianlin Shi, Direct Synthetic Strategy of Mesoporous ZSM-5 Zeolites by Using Conventional Block Copolymer Templates and the Improved Catalytic Properties, *ACS Catalysis*, 1, 4, (2011) 287-291 <http://dx.doi.org/10.1021/cs1000976>
- [9] Alexander Sachse, Caroline Wuttke, Urbano Díaz, Michèle Oberson de Souza, Mesoporous Y zeolite through ionic liquid based surfactant templating, *Microporous and Mesoporous Materials*, 217, (2015) 81-86 <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.05.049>
- [10] S. N. Azizi, A. R. Samadi-Maybodi, M. Yarmohammadi, Synthesis of NaA zeolite using PTMAOH(phenyltrimethylammoniumhydroxide): hydrothermal and microwave heating methods and comparison of their XRD patterns, *Open Journal of Inorganic Chemistry*, 2, 1, (2012) 1-5 <http://dx.doi.org/10.4236/ojic.2012.21001>
- [11] Fatin Hasan, Ranjeet Singh, Gang Li, Dongyuan Zhao, Paul A. Webley, Direct synthesis of hierarchical LTA zeolite via a low crystallization and growth rate technique in presence of cetyltrimethylammonium bromide, *Journal of Colloid and Interface Science*, 382, 1, (2012) 1-12 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.05.027>
- [12] Idris A. Bakare, Oki Muraza, Adnan M. Al-Amer, Zain H. Yamani, The effect of non-ionic surfactant in the microwave-assisted synthesis of MTT zeolite optimized by Taguchi method, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 50, (2015) 314-321 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2014.12.033>
- [13] Lei Wang, Weiya Yang, Chunling Xin, Fengxiang Ling, Wanfu Sun, Xiangchen Fang, Ruochen Yang, Synthesis of nano-zeolite IM-5 by hydrothermal method with the aid of PEG and CTAB, *Materials Letters*, 69, (2012) 16-19 <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2011.11.073>
- [14] Thuat T. Trinh, Xavier Rozanska, Francoise Delbecq, Philippe Sautet, The initial step of silicate versusaluminosilicate formation in zeolite synthesis: a reaction mechanism in water with a tetrapropylammonium template, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14, 10, (2012) 3369-3380 <http://dx.doi.org/10.1039/C2CP23370C>
- [15] Richard Maling Barrer, *Hydrothermal chemistry of zeolites*, Academic Press, 1982.
- [16] Milton J. Rosen, *Surfactants and interfacial phenomena*, Wiley, 2004.
- [17] Halimatun Hamdan, *Introduction to Zeolites: Synthesis, Characterization, and Modification*, Universiti Teknologi Malaysia, Kuala Lumpur, 1992.
- [18] M. M. J. Treacy, J. B. Higgins, *Collection of Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites Fifth (5th) Revised Edition*, Elsevier Science, 2007.



Isolasi Bakteri Endofit pada Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *Rubrum*) Penghasil Senyawa Antioksidan

Okky Triana^a, Purbowatiningrum Ria Sarjono^{a,*}, Nies Suci Mulyani^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: purbowatining@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

endophytic bacteria, antioxidants, red ginger (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*)

Kata kunci:

Bakteri endofit, Antioksidan, jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*)

Abstract

This research has been done about solation of Endophytic Bacteria on Rhizome Red Ginger (*Zingiber officinale* Linn. Var *rubrum*) as producer of antioxidan compounds. The purpose of this research is to obtain isolates of endophytic bacteria in symbiosis with red ginger rhizome, obtain data antioxidant activity by DPPH method and find out information about the chemical content of secondary metabolites of endophytic bacteria. The method used in this study are surface sterilization and spreading on YMA medium followed by antioxidant activity is analyzed by using DPPH radical scavenging method and phytochemical screening. This study resulted in three isolates of endophytic bacteria isolates namely J₁, J₂ isolates and isolates J₃ which has a different cell morphology as well as having the most effective antioxidant activity at concentrations of 31.25 ppm with values % inhibition on isolates J₁, J₂ and J₃, respectively for 22,71%; 20.86% and 13.08% and all the secondary metabolites of endophytic bacterial isolates contain flavonoids and saponins.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi bakteri endhofit pada jahe merah (*zingiber officinale* linn. var *rubrum*) penghasil senyawa antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri endofit yang bersimbiosis dengan rimpang jahe merah, memperoleh data aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan mengetahui informasi mengenai kandungan kimia metabolit sekunder bakteri endofit. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *surface sterilization* dan *spreading* pada media YMA dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH dan penapisan fitokimia. Tahapan penelitian ini meliputi isolasi bakteri endofit yang bersimbiosis dengan rimpang jahe, produksi metabolit sekunder isolat bakteri endofit, uji aktivitas antioksidan dan penapisan fitokimia. Penelitian ini menghasilkan tiga isolat bakteri endofit yaitu isolat J₁, isolat J₂ dan isolat J₃ yang memiliki morfologi sel berbeda serta memiliki aktivitas antioksidan yang paling efektif pada konsentrasi 31,25 ppm dengan nilai % inhibisi pada isolat J₁, J₂ dan J₃ berturut-turut sebesar 22,71% ; 20,86% dan 13,08% dan semua metabolit sekunder isolat bakteri endofit memiliki kandungan flavanoid dan saponin.

1. Pendahuluan

Penyakit yang timbul akhir-akhir ini disebabkan karena adanya radikal bebas. Maka dari itu tubuh memerlukan suatu substansi untuk menangkap radikal

bebas yang bisa disebut dengan antioksidan. Menurut Ito *dkk.* [1] antioksidan sintetik memiliki efek samping yaitu dapat menimbulkan karsinogenik dalam konsentrasi yang berlebih, maka dari itu penggunaan

antioksidan alami sangat potensial untuk dikembangkan.

Antioksidan dapat dihasilkan dari bakteri endofit yang bersimbiosis pada tumbuhan yang juga memiliki aktivitas antioksidan [2]. Hal ini dikarenakan adanya pertukaran genetik dan hubungan evolusi yang panjang.

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. *Var Rubrum*) diketahui mempunyai beberapa senyawa yang berperan pada aktivitas antioksidan. Menurut Aruoma dkk. [3] senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan dalam jahe merah meliputi β -karoten, asam askorbat, terpenoid, alkaloid, dan polifenol seperti flavonoid, glikosida flavonoid, rutin, dll. Tanaman jahe merah dimungkinkan memiliki bakteri endofit yang berpotensi menghasilkan antioksidan.

Penelitian terdahulu melaporkan aktivitas antimikroba metabolit sekunder mikroba endofit yang diisolasi dari akar jahe merah, namun sampai saat ini belum pernah dilaporkan mengenai aktivitas antioksidan metabolit sekunder bakteri endofit dari rimpang jahe merah. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder isolat bakteri endofit dan mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam metabolit sekunder tersebut.

2. Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan antara lain erlenmeyer 250 mL; gelas ukur 100 mL, 50 mL, dan 25 mL; gelas beker 1000 mL, 500 mL, dan 50 mL; labu ukur 1000 mL; tabung reaksi, cawan petri, neraca analitik, spirtus, pengaduk, kaca arloji, kawat ose, micro pipet, shaker, inkas, *spreader*, autoklaf (Clinical Autoclave Pretige Medical Series 2100), *freeze dryer*, mikroskop, sentrifuge (Hettich Zentrifugen Micro 200R) dan spektrofotometer UV-VIS.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah **rimpang jahe** merah (*Zingiber officinale* Linn *Var. rubrum*), *Yeast extract*, *Dextrosa*, *Malt Extract Agar*, Nystatin, *soluble strach*, pepton, etanol 70%, kalsium dipoklorit, aquades steril, DPPH, aquades, safranin, alkohol aseton, lugol iodine, pewarna kristal ungu violet, metanol, asam klorida p.a.10%, amoniak p.a 25%, kloroform p.a., kertas saring, pereaksi Dragendorff, pereaksi mayer, serbuk magnesium, amil alkohol p.a., asam klorida p.a. 2 N, ferri klorida p.a 1%, natrium hidroksida p.a. 1 N, anhidrida asam asetat p.a., dietil eter p.a dan asam sulfat p.a.

Preparasi dan Sterilisasi Bahan Baku

Bahan baku jahe merah didapatkan dari perkebunan jahe di daerah Ungaran, Semarang. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode *surface sterilization*. Sampel disterilisasi permukaan dengan cara merendamnya dalam etanol 70% selama 60 detik. Langkah berikutnya perendaman dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$

5,25% selama 3 menit, kemudian direndam lagi dengan etanol 70% selama 60 detik. Langkah terakhir adalah pembilasan dengan menggunakan aquades steril secara bertahap dengan pengulangan sebanyak tiga kali [4]. Bagian yang sudah disterilisasi selanjutnya digerus menggunakan mortar secara aseptik untuk mendapatkan ekstrak dari rimpang jahe merah tersebut.

Isolasi Bakteri Endofit

Ekstrak sampel yang telah diperoleh kemudian diambil sebanyak 100 μL , kemudian diinokulasikan secara aseptik pada media *yeast malt agar (YMA)* dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang hingga koloni bakteri endofit tumbuh [5]. Berdasarkan perbedaan kenampakan morfologinya, koloni bakteri endofit dapat dipisahkan sehingga mendapatkan isolat tunggal.

Produksi Metabolit Sekunder Isolasi Bakteri Endofit

Sebanyak 2 mL kultur hasil peremajaan diinokulasikan pada 200 mL media cair dan diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 25° C. Kultur di panen pada saat fasa stasioner mendekati fasa kematian sesuai dengan hasil kurva pertumbuhan yang didapatkan. Tahap selanjutnya kultur disentrifugasi 5000 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Supernatan dari kultur ini selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *freeze dryer*.

Uji Aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder

Uji aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder menggunakan metode DPPH. Setiap sampel dibuat larutan induk 1000 ppm. Setiap sampel diencerkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm. Setiap konsentrasi sampel dipipet sebanyak 0,2 mL kedalam *microplate* ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan standar (vitamin C) dibuat dengan konsentersasi 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm dan 0,3125 ppm.

Persen inhibisi dapat dihitung dari persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(c-s)}{c} \times 100\%$$

Keterangan:

S = Absorbansi sampel

C= Absorbansi tidak mengandung sampel

Penapisan Fitokimia

Pengujian senyawa metabolit sekunder dilakukan terhadap ekstrak isolat bakteri endofit rimpang jahe merah dengan tujuan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimia meliputi uji alkaloid, saponin, flavanoid, tanin, triterpenoid dan steroid dengan menggunakan metode Farnsworth [6].

3. Hasil dan Pembahasan

Preparasi dan Sterilisasi Bahan

Sampel tanaman jahe merah (*Z. Officinale* Linn. *Var Rubrum*) diperoleh dari perkebunan jahe di daerah Ungaran, Semarang. Jahe yang telah diperoleh,

selanjutnya disterilisasi permukaan dengan merujuk pada metode [7]. Menurut Purwanto [8], etanol berfungsi untuk mendenaturasi protein bakteri kontaminan sehingga tidak mengganggu proses isolasi. Proses selanjutnya, jahe merah direndam dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 3,125% selama 3 menit. Dalam larutan, *calcium hypochlorite* akan melepaskan radikal klor (Cl) yang mampu merusak membran dan protein bakteri [8]. Perendaman dengan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ tidak boleh terlalu lama untuk mencegah masuknya $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ melalui pori-pori sampel yang akan mematikan bakteri endofit di dalam sampel. Tahap selanjutnya direndam di dalam $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, kemudian direndam lagi dengan etanol 70% selama 60 detik. Langkah terakhir adalah pembilasan dengan menggunakan aquades steril secara bertahap dengan pengulangan sebanyak tiga kali [4]. Hal ini bertujuan untuk mencuci sisa etanol dan $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ pada tahap sebelumnya.

Sterilisasi permukaan bertujuan untuk menghilangkan bakteri kontaminan yang terdapat pada sampel rimpang jahe merah yang telah diperoleh sehingga bakteri yang diisolasi hanya merupakan bakteri endofit dari rimpang jahe merah tersebut. Bagian yang sudah disterilisasi selanjutnya digerus menggunakan mortar secara aseptik agar bakteri endofit yang terdapat di dalam jaringan jahe merah dapat keluar dan bisa diisolasi. Dengan mendapatkan ekstrak kasar rimpang jahe merah, diharapkan bakteri endofit terdapat di dalamnya dan bisa diisolasi dengan media *Yeast Malt Agar* (YMA).

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit

Isolasi dilakukan selama 72 jam penginkubasian pada suhu ruang. Hasil yang didapat pada tahap isolasi adalah diperoleh 3 isolat bakteri dengan karakteristik koloni berbeda yang diberi nama isolat J₁, isolat J₂ dan isolat J₃. Gambar 1 menunjukkan hasil isolasi bakteri endofit dari rimpang jahe merah (*Z.officinale* Linn. *Var rubrum*)



Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri Endofit pada Ja

Hasil isolasi bakteri endofit dari rimpang jahe merah pada jam ke-72 didapatkan 3 isolat bakteri yang memiliki karakter koloni dan morfologi sel yang berbeda, terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat bakteri endofit dari rimpang jahe merah

Isolat Koloni	Morfologi				
	Warna	Bentuk	Tepi	Gram (+/-)	Bentuk sel
J1	Putih	Tidak beraturan	Tepian bergelombang	negatif	diplobasil
J2	Putih susu	Bulat	Bulat, bertepi	negatif	streptobasil
J3	Putih bening	Tidak beraturan	Tepian berlekuk	negatif	monobasil

Hasil karakterisasi gram bakteri menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri merupakan bakteri gram negatif. Pengelompokan bakteri ini berdasarkan pada komponen dinding selnya. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks daripada bakteri gram positif. Dari data di atas juga memperlihatkan bahwa ketiga isolat menunjukkan bahwa karakter dan morfologi sel berbeda. Sehingga diharapkan memiliki aktivitas antioksidan dari metabolit sekundernya berbeda pula.

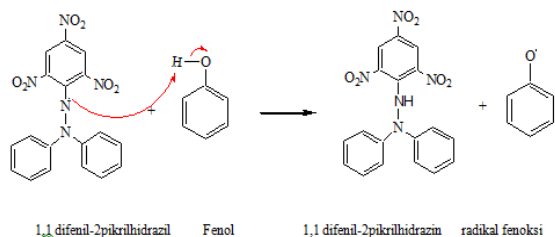
Produksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Endofit

Tahap Produksi Metabolit Sekunder bertujuan untuk mendapatkan metabolit sekunder yang diharapkan memiliki aktivitas antioksidan. Produksi metabolit sekunder isolat bakteri dilakukan selama 45 jam.

Tahap setelah mencapai jam ke-45, media fermentasi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan sel bakteri dan supernatan. Sentrifugasi pada suhu rendah dimaksudkan agar metabolit sekunder yang terdapat didalam sel tidak rusak. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kasar metabolit sekunder. Ekstrak kasar ini selanjutnya dilakukan pemekatan dengan menggunakan metode *freeze drying*. Massa sampel hasil *freeze dry* isolat J₁ sebesar 0,427 g, isolat J₂ sebesar 0,418 g dan isolat J₃ sebesar 1,169 g. Perbedaan massa sampel yang dihasilkan oleh isolat bakteri menunjukkan setiap bakteri menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda. Oleh karena itu kemungkinan aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh ketiganya juga berbeda.

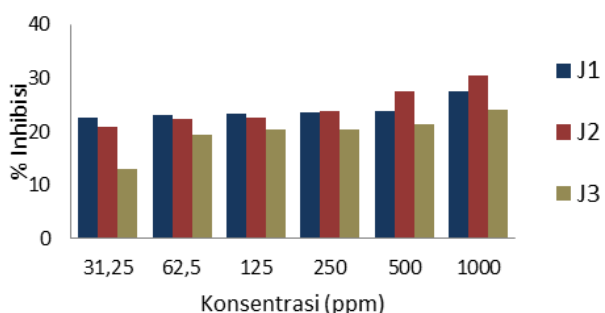
Aktivitas Antioksidan

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan data aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari isolat bakteri endofit yang didapatkan. Metode pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan DPPH yakni melalui mekanisme penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan. Mekanisme reaksi dari Reaksi antara DPPH dengan suatu molekul antioksidan ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi antara DPPH dengan suatu molekul antioksidan [9]

Adapun hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap metabolit bakteri endofit jahe merah dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran antioksidan metabolit sekunder

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa terdapat korelasi antara meningkatnya konsentrasi dengan % inhibisi. Hal ini dikarenakan karena dengan meningkatnya konsentrasi sampel maka memiliki metabolit sekunder yang lebih banyak sehingga dapat meningkatkan % inhibisinya. Namun peningkatan konsentrasi terhadap % inhibisi tidak terlalu signifikan. Pada isolat J₁ di konsentrasi 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 22,72%; 23,09%; 23,34%; 23,58%; 23,95% dan 27,53%. Pada isolat J₂ di konsentrasi 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 20,86%; 22,46%; 22,71%; 23,95%; 27,65% dan 30,61%. Pada isolat J₃ 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; dan 1000 ppm mempunyai nilai % inhibisi berturut-turut sebesar 13,08%; 19,5%; 20,37%; 20,5%; 21,35% dan 24,07%.

Dengan peningkatan konsentrasi, nilai % inhibisi ketiga isolat bakteri endofit hanya meningkat sebesar 1,01-1,14 kali lebih tinggi. Apabila konsentrasi tertinggi (1000 ppm) dibandingkan dengan konsentrasi terendah (31,25 ppm) nilai persen inhibisi ketiga isolat bakteri endofit yaitu J₁; J₂ dan J₃ hanya meningkat sebesar 1,21; 1,46; dan 1,84 kali. Dari pemaparan data diatas, dapat disimpulkan bahwa ketiga isolat mempunyai konsentrasi optimal untuk meredam radikal bebas pada konsentrasi terendah yaitu pada konsentrasi 31,25 ppm.

Senyawa yang digunakan sebagai pembanding pada pengujian ini adalah asam askorbat. pada pengujian ini

asam askorbat memiliki kemampuan meredam radikal bebas sebesar 57,03% pada konsentrasi 10 ppm. Perbedaan kemampuan inhibisi dari metabolit sekunder isolat bakteri dengan asam askorbat disebabkan karena asam askorbat merupakan senyawa yang telah diketahui memiliki ikatan rangkap terkonjugasi untuk mendonorkan proton, sedangkan sampel merupakan padatan metabolit sekunder yang belum murni sehingga kemampuan untuk meredam radikal bebas kurang optimal.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui senyawa kimia yang berperan dalam meredam radikal bebas. Sampel yang digunakan pada tahap penapisan fitokimia ini adalah rimpang jahe merah yang digunakan sebagai simplisia tanaman inang dan endapan metabolit sekunder dari hasil freeze dry. Rimpang jahe merah digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui senyawa kimia sebelum dilakukan isolasi. Golongan kimia yang diidentifikasi pada penelitian ini antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid Hasil dari penapisan fitokimia tertera pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil penapisan fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil			
	J ₁	J ₂	J ₃	Simplisia
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Tanin	+	+	-	+
Saponin	+	+	+	+
Steroid	-	-	-	-
Triterpenoid	+	+	-	+

Pada hasil penapisan fitokimia penelitian ini terdapat beberapa senyawa dari tumbuhan inang yang tidak mampu dihasilkan oleh isolat bakteri endofit kulit rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Linn. Var *Rubrum*). Menurut Nofiani dkk. [10] terdapat dugaan bahwa isolat tersebut memiliki gen pengkode pembentukan senyawa metabolit sekunder, namun tidak terekspresi pada media produksi yang digunakan. Gen tersebut baru terekspresi ketika diinduksi terlebih dahulu. Pada media produksi yang digunakan kemungkinan tidak ada inducer untuk mengekspresikan gen pembentukan senyawa metabolit sekunder.

Adanya aktivitas antioksidan dikarenakan pada isolat J₁, J₂, dan J₃ mempunyai senyawa metabolit sekunder yang potensial untuk meredam radikal bebas yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu komponen yang mengandung gugus fenol. Perbedaan aktivitas antioksidan dari ketiga isolat disebabkan karena perbedaan kandungan senyawa yang akan menyumbangkan hidrogennya. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian [3] yang menunjukkan bahwa senyawa golongan flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan.

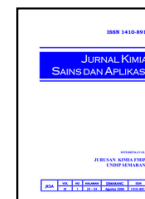
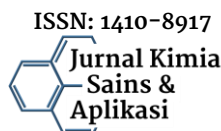
4. Kesimpulan

Diperoleh tiga isolat bakteri endofit dari rimpang jahe merah (isolat J₁, isolat J₂, dan isolat J₃). Isolat bakteri yang diperoleh memiliki bentuk beragam yakni diplobasil (isolat J₁), streptobasil (isolat J₂) dan monobasil (isolat J₃). Semua metabolit sekunder isolate mampu menghambat radikal bebas pada konsentrasi yang paling efektif yaitu pada konsentrasi 31,25 ppm dengan nilai % inhibisi pada isolat J₁, J₂ dan J₃ berturut-turut sebesar 22,71%; 20,86% dan 13,08%. Kandungan kimia yang terdapat pada semua isolat meliputi flavonoid dan saponin.

spons dari pulau Lemukutan, Kalimantan Barat, e-Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis, 1, 2, (2009) 33-41

5. Daftar Pustaka

- [1] N. Ito, M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, M. Tatematsu, Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 24, 10, (1986) 1071-1082
[http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90291-7](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(86)90291-7)
- [2] Gary Strobel, Eugene Ford, Jeerepun Worapong, James K. Harper, Atta M. Arif, David M. Grant, Peter C. W. Fung, Raymond Ming Wah Chau, Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 60, 2, (2002) 179-183
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00062-6)
- [3] Okezie I. Aruoma, Jeremy P. E. Spencer, Donna Warren, Peter Jenner, John Butler, Barry Halliwell, Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations, *Food Chemistry*, 60, 2, (1997) 149-156
[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(95\)00254-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(95)00254-5)
- [4] Justin T Coombs, Christopher MM Franco, Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots, *Applied and environmental microbiology*, 69, 9, (2003) 5603-5608
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.9.5603-5608.2003>
- [5] Sri Pujiyanto, Rejeki Siti Ferniah, Aktifitas inhibitor alpha-glukosidase bakteri endofit PR-3 yang diisolasi dari tanaman pare (*Momordica charantia*), *Bioma*, 12, 1, (2010) 1-5
- [6] Norman R. Farnsworth, Biological and phytochemical screening of plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, (1966) 225-276
<http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- [7] Abdul Kafur, Anisa Basheer Khan, Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthes roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity, *Iranian Journal of Biotechnology*, 9, 4, (2011) 302-306
- [8] Purwanto, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penghambat Polimerisasi HEM dari Fungsi Endofit Tanaman *Artemisia annua* L., in: *S2 Ilmu Farmasi*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- [9] Hiroe Kikuzaki, Nobuji Nakatani, Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents, *Journal of Food Science*, 58, 6, (1993) 1407-1410
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x>
- [10] Risa Nofiani, Siti Nurbetty, Ajuk Sapar, Aktivitas antimikroba ekstrak metanol bakteri berasosiasi



Molecular Docking of Interaction between E-Cadherin Protein and Conformational Structure of Cyclic Peptide ADTC₃ (Ac-CADTPC-NH₂) Simulated on 20 ns

Atiatul Manna^a, Marlyn Dian Laksitorini^b, Dwi Hudiyantri^a, Parsaoran Siahaan^{a,*}

^a Physical Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

^b Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta

* Corresponding author: parsaoran_s@undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords:</p> <p>ADTC₃, E-cadherin domain EC₁, Gromacs, docking</p>	<p>The treatment of diseases that attack the brain is very difficult, because the delivery of drug molecules to the brain is often hindered by the molecules of blood-brain barrier (BBB). Thus, it was developed the new method using synthetic peptide which derived from the amino acids sequence of cadherin and ADTC₃ predicted able to modulate the intercellular junction peptide. The intermolecular interaction between ADTC₃ and E-cadherin is hypothesized as the driving force of modulation. In this research have been calculated the interaction energy between ADTC₃ and E-cadherin. The method used in this research is molecular dynamics (MD) and molecular docking. The results show that cyclic peptide ADTC₃ (Ac-CADTPC-NH₂) simulated for 20 ns (20,000 ps) has considerable interaction with EC₁ domain of E-cadherin which have the binding energies $-31.55 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and inhibition constant K_i $2.96 \mu\text{M}$ at the 4487 conformation. This highly interaction energy was predicted as the driving force in modulating intercellular junctions. The binding site of E-cadherin reside on amino acid residues Asp1, Trp2, Val3, Ile4, Lys25, Met92 in the adhesion arm-acceptor pocket region.</p>
<p>Kata kunci:</p> <p>ADTC₃, E-cadherin domain EC₁, Gromacs, docking</p>	<p>Abstrak</p> <p>Pengobatan penyakit yang menyerang otak sangat sulit dilakukan karena penghantaran molekul obat menuju otak terhalang oleh molekul-molekul <i>blood-brain barrier</i> (BBB). Untuk mengatasinya telah dikembangkan metode baru dengan memodulasi <i>junction</i> antar sel menggunakan peptida. Salah satu peptida yang diperkirakan mampu memodulasi adalah ADTC₃, yang diturunkan dari susunan asam amino kadherin. Modulasi terjadi diduga karena interaksi antara ADTC₃ dengan E-kadherin. Pada penelitian ini telah dihitung energi interaksi antara ADTC₃ dengan E-kadherin. Metode yang digunakan adalah dinamika molekul (DM) dan <i>molecular docking</i>. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peptida siklik ADTC₃ (Ac-CADTPC-NH₂) hasil simulasi 20 ns (20.000 ns) berinteraksi kuat dengan domain EC₁ E-kadherin dengan <i>energy binding</i> sebesar $-31,55 \text{ kJ.mol}^{-1}$ dan tetapan inhibisi K_i sebesar $2,96 \mu\text{M}$ pada konformasi ke-4487. Interaksi yang kuat ini diperkirakan sebagai daya penggerak memodulasi <i>junction</i> antar sel. Interaksi antara ADTC₃ dengan E-kadherin terjadi pada situs residu E-kadherin Asp1, Trp2, Val3, Ile4, Lys25, Met92 yang berada pada daerah <i>adhesion arm-acceptor pocket</i>.</p>

1. Pendahuluan

Pengobatan penyakit yang menyerang otak merupakan penyakit yang sulit dilakukan karena penghantaran molekul obat menuju ke otak sangat sulit [1]. Hal ini disebabkan karena adanya penghalang biologis yaitu *blood-brain barrier* (BBB) [2]. Transpor obat melewati BBB dapat dicapai melalui jalur transelular dan paraselular [3]. Jalur transpor yang mungkin dilewati oleh senyawa makromolekul adalah jalur paraselular. Namun, pada jalur ini terdapat persimpangan ketat (*tight junction*) yang merupakan komponen paling apikal dan umumnya dianggap sebagai penghalang untuk permeabilitas paraselular [4]. Molekul yang dapat melewati jalur ini memiliki ukuran diameter kurang dari 11 Å atau dengan berat molekul kurang dari 500 Dalton [5]. Dengan demikian, kehadiran BBB menjadi tantangan tersendiri dalam proses penghantaran obat menuju sel target. Salah satu cara untuk meningkatkan sistem penghantaran obat adalah dengan meningkatkan porositas *tight junction* dengan menghambat interaksi kadherin-kadherin pada *adherens junction* [6].

Kadherin merupakan protein transmembran yang terdiri dari 5 domain ekstraselular (EC1–EC5) dengan ion Ca^{2+} berinteraksi sebagai penghubung antar bagian dari E-Kadherin [7]. Kadherin banyak ditemukan pada *zonula adherens* [8]. *Zonula adherens* adalah salah satu bagian *junction* antar sel yang berada dalam *zonula occluden* (*junction* ketat) dan *Demosom*. Dalam pembentukan *junction* antar sel, molekul kadherin pada satu sel akan berinteraksi dengan molekul kadherin pada sel lain yang berada di dekatnya membentuk *zonula adherens* [9]. Porositas pada jalur paraselular dapat ditingkatkan dengan peptida yang sekuennya diturunkan dari molekul kadherin itu sendiri, seperti turunan peptida HAV dan ADT. Turunan peptida ADT seperti ADTC3 yang diturunkan dari kadherin dapat menempati situs ikatan (*binding site*) pada molekul kadherin dan menghalangi interaksi antar molekul *adherent junction* (kadherin) pada sel bersebelahan, sehingga keketatan *tight junction* antar sel dapat diatur atau dimodulasi. Modulasi dapat juga dilakukan dengan kitosan yang sekaligus dapat berfungsi sebagai pembawa obat atau enkapsulator pada sistem *drug delivery* dan *drug targeting* [10, 11].

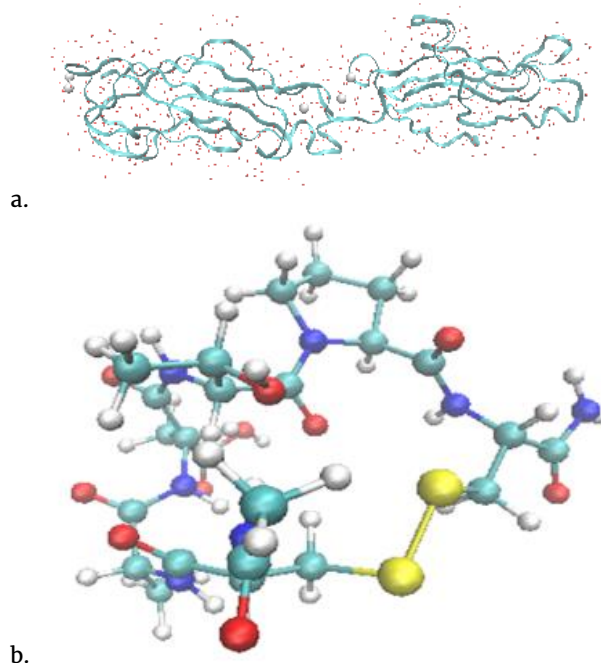
Laksitorini [12] telah mensintesis dan menggunakan turunan peptida kadherin ADT6 seperti ADTC1, ADTC5, dan ADTC6 untuk meningkatkan penghantaran molekul obat dari otak ke sistem saraf pusat. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa peptida kadherin ADT6 memiliki kemampuan menghambat interaksi *junction* antar sel di dalam sel MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) dan pembentukan peptida siklik dapat meningkatkan kemampuan peptida kadherin untuk memodulasi *junction* antar sel [12]. Alaofi *dkk.* [1] menginteraksikan peptida cHAVc3 dengan E-kadherin domain EC1 dan hasilnya menunjukkan bahwa peptida cHAVc3 mampu meningkatkan porositas *junction* antar sel [1]. Selain turunan peptida kadherin seperti peptida ADTC1, ADTC5, dan ADTC6, terdapat turunan ADT6 yang

belum dilakukan penelitian secara eksperimen maupun komputasi yaitu peptida ADTC3. Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan studi interaksi antara peptida siklik ADTC3 dengan E-kadherin domain EC1–EC2 dengan *molecular docking*. *Molecular docking* merupakan pemodelan komputasi yang dilakukan untuk memprediksi interaksi dan situs ikatan. Pemodelan komputasi juga dapat menjelaskan daya penggerak yang menyebabkan terjadinya proses interaksi antara peptida ADTC3 dengan E-kadherin domain EC1–EC2.

2. Metode Penelitian

Preparasi Protein dan peptida siklik ADTC3

Pada penelitian ini model molekul yang digunakan yaitu struktur kristal E-kadherin domain EC1–EC2 (kode 2O72) sebagai *host* dan peptida siklik ADTC3 sebagai *guest* yang diperlihatkan pada Gambar 1. Peptida linier ADTC3 dibuat dengan menggunakan *software* program PyMol [13]. Kemudian dilakukan pembentukan siklik peptida ADTC3 (siklik(1,6)Ac-CADTPC-NH₂) dengan membentuk ikatan disulfida pada gugus thiol residu sistein dengan menggunakan *software* program avogadro.



Gambar 1. (a) Struktur kristal E-kadherin domain EC1–EC2 (kode 2O72), (www.rcsb.org/pdb). (b) Struktur peptida siklik ADTC3.

Simulasi Dinamika Molekular (DM)

Simulasi dinamika molekular dilakukan menggunakan *software* program GROMACS v.4.6.5 [14]. Simulasi DM dilakukan untuk mengetahui dinamika dan optimasi peptida siklik ADTC3 sehingga didapatkan konformasi dan energi terendah pada pelarut air dan setelah ditambahkan ion. Pada persiapan sistem dilakukan pemberian medan gaya (*force field*) *charmm27* serta ditambahkan pelarut air *tip3p* pada ruang kubus berukuran 1 nm [15]. Setelah itu, pada sistem ditambahkan ion 4Na^+ dan 4Cl^- sehingga diperoleh

konsentrasi fisiologis sebesar 0,15 M. Minimasi energi pada sistem dilakukan untuk merelaksasi gaya berlebih pada sistem. Simulasi DM dilakukan selama 20 ns untuk memperoleh 20.000 konformasi dengan peptida pada posisi tidak dan tertahan/*restraint*. Kemudian kesetimbangan sistem antara konformasi peptida dengan pelarut/ion menjadi representasi yang diharapkan pada temperatur 300 K dan tekanan 1 atm dengan dilakukan simulasi DM selama 100 ps. Setelah sistem setimbang, dilakukan proses menghasilkan trayektori dengan parameter berubah dengan melakukan simulasi DM selama 20 ns (20.000 ps) pada temperatur konstan 300 K dan volume konstan. Trayektori kemudian dianalisis dengan metode RMSD (*root-mean-square-deviation*) C α terhadap struktur awal. Analisis energi total hasil simulasi DM memilih 20 struktur konformasi yang memiliki energi terendah.

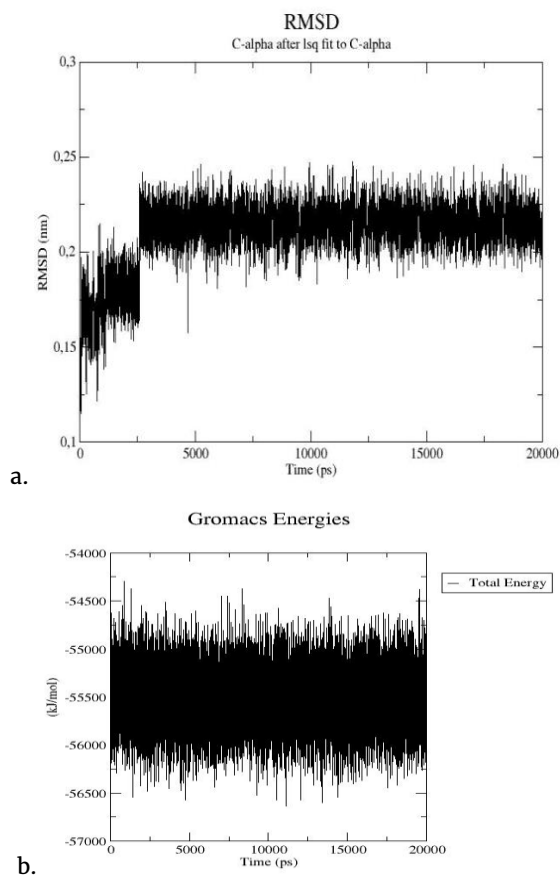
Molecular docking

Molecular docking dilakukan dengan menggunakan *software* program AutoDock 4.2 pada bagian EC1 dari domain EC1–EC2 [16]. Pada *molecular docking* dilakukan Autogrid dan Autodock. Tahapan Autogrid meliputi pra-evaluasi *energy binding* secara cepat antara tipe atom pada ligan ADTC3 siklik (C, HD, N, OA, SA), elektrostatik, dan desolvasi dengan protein E-kadherin. Tahapan Autogrid berikutnya adalah evaluasi menggunakan *gridbox* dengan *grid spacing* 0,375 Å pada situs ikatan protein. Selanjutnya proses Autodock yaitu proses docking dimulai dari E-kadherin sebagai molekul rigid dan memilih peptida siklik ADTC3 sebagai ligan. Pencarian konformasi menggunakan algoritma *Lamarckian-Genetic* dengan penentuan *energy binding* menggunakan pendekatan medan gaya energi bebas semi-empirik [17]. Jumlah algoritma yang dijalankan dan jumlah proses evaluasi masing-masing di-*set* sebesar 150 dan 10.000.000.

3. Hasil dan Pembahasan

Simulasi Dinamika Molekular (DM)

Hasil simulasi DM peptida siklik ADTC3 menggunakan GROMACS dapat diperlihatkan pada Gambar 2. Pada simulasi DM peptida siklik ADTC3 dilakukan analisis RMSD yang bertujuan untuk mengetahui pergerakan peptida yang terlarut di dalam air dan ion dengan membandingkan rantai peptida pada struktur *native* pada C α yang mempunyai jumlah residu (N) sama dengan struktur *alternative* selama 20 ns. Berdasarkan analisis RMSD pada simulasi DM 20 ns diperoleh jarak fluktuasi sebesar 1,13–2,47 Å. Pergerakan molekul peptida dikatakan stabil jika RMSD tidak melebihi 3 Å. Jumlah struktur konformasi yang lebih banyak dapat diperoleh dengan mempebesar waktu simulasi menjadi 120 ns seperti yang dilakukan pada penelitian sebelumnya [18].

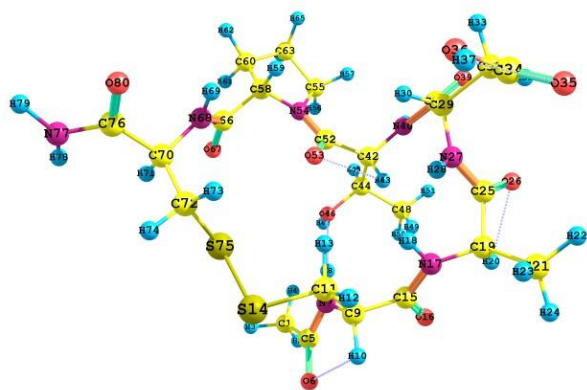


Gambar 2. (a) Grafik RMSD C α dan (b) Grafik energi total

Hasil analisa RMSD, Gambar 2a, menunjukkan bahwa pergerakan molekul peptida siklik ADTC3 cenderung stabil dan konvergen. Selain itu, dapat dibuktikan dengan perubahan jarak antara S₁₄...S₇₈ (Gambar 3) pada *start* dan *end* terminus asam amino sistein yang cenderung stabil ditunjukkan pada Tabel 1. Selanjutnya, dilakukan analisis energi total bertujuan untuk mencari struktur peptida yang paling stabil sesuai dengan kondisi mendekati yang sebenarnya. Perubahan konformasi peptida siklik ADTC3 mengalami *folding/unfolding*. Peptida yang mengalami *folding* strukturnya lebih stabil karena memiliki energi lebih rendah [19]. Pada analisis ini dilakukan pemilihan 20 konformasi pada energi terendah untuk dilakukan *molecular docking* dapat dilihat pada Tabel 2. Karena tidak semua molekul yang memiliki energi terendah dapat berinteraksi baik dengan reseptornya.

Tabel 1. Pergerakan peptida siklik ADTC3 selama DM 20 ns

Waktu (ns)	Energi Total (kJ/mol)	Rs _{14...S75} (Å)
0	-55025,59	2,02864
1	-55446,05	2,02864
5	-56268,04	2,02870
10	-55924,36	2,02894
15	-55202,27	2,02889
20	-56017,95	2,02876



Gambar 3. Perubahan jarak jarak antara S₁₄...S₇₈ pada struktur ADTC3

Tabel 2. Energi 20 struktur konformasi energi terendah hasil simulasi DM 20.000 struktur konformasi

Kode	Energi Total (kJ/mol)	Waktu Simulasi (ps)	RMSD (Å)
A1	-56636,85	11139	2,26
A2	-56596,10	13426	2,15
A3	-56572,05	10534	2,12
A4	-56571,27	12027	2,16
A5	-56569,43	4736	2,11
A6	-56542,19	14388	1,95
A7	-56478,18	2334	1,53
A8	-56474,81	4487	2,04
A9	-56452,94	3732	2,11
A10	-56444,52	17571	2,09
A11	-56436,55	6577	2,31
A12	-56429,74	13382	2,13
A13	-56424,76	1939	2,04
A14	-56418,74	12879	2,16
A15	-56414,23	18139	2,22
A16	-56413,98	9943	2,25
A17	-56407,62	14443	2,15
A18	-56401,52	15364	2,15
A19	-56399,59	4401	2,13
A20	-56390,93	2358	1,90

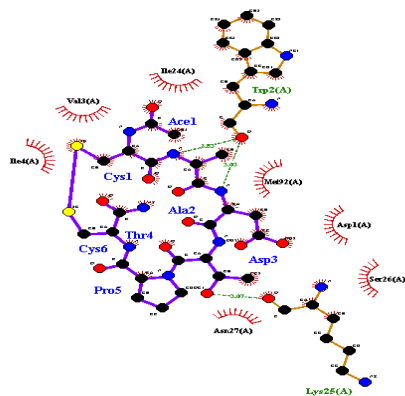
Molecular docking

Molecular docking merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan untuk mendesain molekul obat atau sering disebut *structure-based drug design* (SBDD) karena kemampuannya memprediksi dengan tingkat akurasi yang tinggi [20]. Pada penelitian ini, *molecular docking* dilakukan untuk mengetahui konformasi dan *energy binding* antara peptida siklik ADTC3 dengan E-kadherin domain EC1-EC2. Peptida siklik ADTC3 memiliki muatan *gasteigen* sebanyak 28 hidrogen non-polar, 9 *rotable bonds*, dan derajat bebas torsi sebanyak 7 dari 32. Docking dilakukan dalam 2 tahap yaitu Autogrid dan Autodock. Tahap Autogrid penentuan posisi *gridbox* dilakukan secara *blind docking*

dengan ukuran *gridbox* 62x62x62. Metode ini dilakukan karena belum diketahui sisi aktif pada E-kadherin domain EC1-EC2 dengan peptida siklik ADTC3. Tahap AutoDock menggunakan parameter *Genetic Algorithm* atau GA sebesar 150 dan populasi sebanyak 150 serta *number of eval* sebesar 10.000.000. Hasil *blind docking* (docking secara acak) yang dilakukan pada 20 struktur konformasi peptida siklik ADTC3, energi paling stabil dan populasi tertinggi terdapat pada Tabel 3. *Energy binding* terendah pada konformasi A8, Gambar 4, dengan energi sebesar -28,16 kJ/mol. Hal ini diperkuat dengan adanya ikatan hidrogen antara E-kadherin dengan ADTC3 melalui residu Trp2...Asp3, Lys25...Thr4, Trp2...Ala2. Jenis ikatan hidrogen berturut-turut yaitu O...NH, O...HG1, O...NH dengan jarak masing-masing yaitu 2,047; 2,184; 2,027 Å. Situs ikatan antara E-kadherin dengan ADTC3 adalah pada residu Asp1, Trp2, Val3, Ile4, Lys25, Met92 dari E-kadherin dengan jumlah residu adalah 6 yang berada pada daerah *adhesion arm-acceptor pocket*. Dalam penelitian Parisini [21] menunjukkan bahwa residu yang berperan pada daerah *adhesion arm* yaitu D1, W2, E89, D90, M92 dan W2,V3, P5Q23, K25 [21].

Tabel 3. *Energy binding*, *K_i*, populasi, dan pose hasil *blind docking*

Kode	Pose	ΔG (kJ/mol)	K _i	Populasi
A1	12	-15,77	1,73 mM	14
A2	78	-15,61	1,85 mM	19
A3	34	-25,44	35,19 μM	36
A4	111	-24,35	54,50 μM	27
A5	102	-23,22	85,87 μM	66
A6	66	-23,60	73,40 μM	32
A7	132	-25,10	39,67 μM	51
A8	148	-28,16	11,58 μM	44
A9	17	-23,85	66,41 μM	54
A10	97	-21,05	207,18 μM	39
A11	41	-20,79	228,71 μM	41
A12	143	-21,05	204,90 μM	24
A13	21	-24,31	55,08 μM	40
A14	129	-23,14	87,79 μM	27
A15	33	-20,96	214,38 μM	30
A16	83	-22,68	105,64 μM	36
A17	54	-22,97	94,22 μM	42
A18	27	-20,63	244,08 μM	36
A19	51	-24,89	43,84 μM	33
A20	87	-25,23	38,09 μM	72

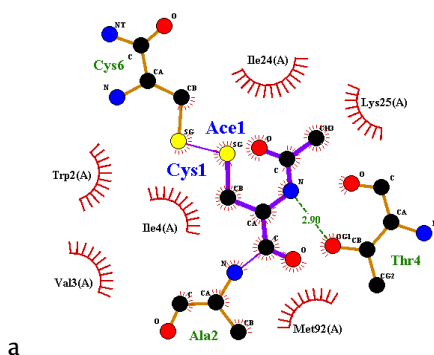


Gambar 4. Struktur *molecular docking* dari E-kadherin domain EC1-EC2 dengan peptida siklik ADTC3 menggunakan program ligplus.

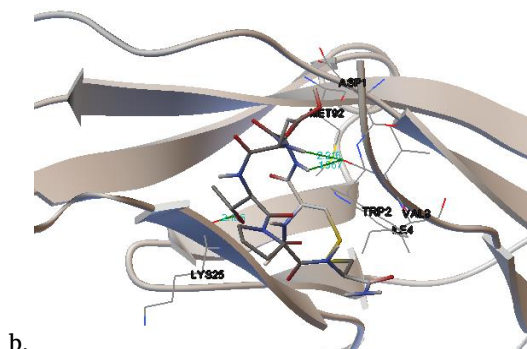
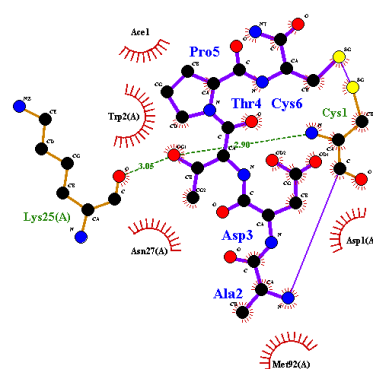
Berdasarkan hasil analisa docking terdapat beberapa *cluster* untuk tiap struktur, pemilihannya dimulai dari struktur dengan energi ikatnya paling minimum. Jika dihasilkan dua struktur atau lebih dengan energi paling minimum, maka dipilih struktur dengan frekuensi terbanyak. Dan hasil tersebut yang akan dilakukan validasi docking.

Validasi docking dengan dilakukan *Re-docking*

Setelah dilakukan *blind docking* dapat diketahui *binding site* antara peptida siklik ADTC3 dengan E-kadherin domain EC1-EC2. Kemudian dilakukan *re-docking* untuk memvalidasi hasil docking dan RMSD harus < 2 Å [22]. *Re-docking* dilakukan pada situs ikatan protein dengan parameter yang sama. Masing-masing konformasi memiliki situs ikatan protein yang berbeda, sehingga memiliki ukuran *gridbox* yang berbeda-beda tetapi *grid spacing* sama yaitu 0,375 Å. Berdasarkan hasil *re-docking* diperoleh *energy binding* terendah pada konformasi A8, Gambar 5, dengan *energy binding* sebesar -31,55 kJ/mol. Situs ikatan antara E-kadherin dengan ADTC3 adalah pada residu Asp1, Trp2, Val3, Ile4, Lys25, Met92, sama seperti pada *blind docking*. Data situs interaksi struktur konformasi A1-A20 terhadap E-kadherin domain EC1 dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5.



a



b.

Gambar 5. Struktur *molecular docking* dari E-kadherin domain EC1-EC2 dengan peptida siklik ADTC3 menggunakan (a) *software* program Ligplus (b) *software* program Autodock.

Tabel 4. Situs interaksi peptida konformasi A dengan E-Kadherin domain EC1-EC2

Kode	Ikatan hidrogen		
	Interaksi	r (Å)	Jenis
A1	-	-	-
A2	-	-	-
A3	Lys25...Cys6	1,886	O...NH
A4	Lys25...Cys6	1,932	O...NH
A5	Trp2...Ala2	1,761	O...NH
	Lys25...Thr4	2,199	O...HG1
A6	Lys25...Cys6	2,014	O...NH
A7	-	-	-
A8	Lys25...Thr4	2,216	O...HG1
	Trp2...Ala2	1,967	O...NH
A9	Trp2...Asp3	2,165	O...NH
	-	-	-
A10	Lys25...Cys6	1,999	O...NH
A11	Lys25...Cys6	1,650	O...NH
A12	Lys25...Cys6	2,075	O...HT1
A13	Lys25...Cys6	1,987	O...NH
A14	Lys25...Cys6	1,840	O...NH
A15	Lys25...Cys6	2,203	O...NH
A16	Lys25...Cys6	2,229	O...HT1
A17	Lys25...Cys6	1,742	O...NH
A18	Lys25...Cys6	1,801	O...NH
A19	Lys25...Asp3	2,717	NZ...OD2
A20	Lys25...Cys6	1,856	O...NH
A20	Lys25...Cys6	1,836	O...NH

Tabel 5. Energy binding dan Ki kode A hasil Re-docking

Kode	Pose	ΔG (kJ/mol)	K_i	RMSD (Å)
A1	123	-24,89	43,77 μM	3,27
A2	33	-25,23	38,01 μM	3,28
A3	10	-28,07	12,02 μM	0,45
A4	96	27,07	17,98 μM	0,49
A5	150	-29,16	7,81 μM	3,57
A6	132	-26,61	21,66 μM	0,83
A7	144	-30,00	5,55 μM	1,09
A8	105	-31,55	2,96 μM	0,26
A9	127	-27,99	12,54 μM	0,49
A10	12	-25,86	29,65 μM	2,84
A11	100	-23,97	62,98 μM	0,42
A12	67	-25,69	31,77 μM	0,50
A13	77	-28,33	10,93 μM	0,41
A14	81	-27,99	12,48 μM	0,87
A15	63	-26,94	18,99 μM	1,14
A16	79	-27,03	18,35 μM	0,29
A17	136	-26,32	24,55 μM	0,29
A18	39	-28,07	12,05 μM	0,51
A19	9	-27,99	12,54 μM	3,10
A20	145	-28,07	12,08 μM	0,44

Pada Tabel 4 dan Tabel 5 dapat dilihat bahwa daya penggerak (*driving force*) yang menyebabkan terjadinya interaksi antara peptida siklik ADTC3 dan E-kadherin domain EC1 adalah *energy binding* dan ikatan hidrogen [19]. Pada struktur konformasi A8 ikatan hidrogen terjadi antara E-kadherin dengan ADTC3 melalui residu Lys25...Thr4, Trp2...Ala2, Trp2...Asp3. Jenis ikatan hidrogen berturut-turut yaitu O...HG1, O...NH, O...NH dengan jarak masing-masing yaitu 2,216; 1,967; 2,165 Å. Interaksi yang paling baik terjadi pada konformasi yang memiliki energi paling minimum yaitu kode A8. *Energy binding* yang semakin negatif dipengaruhi oleh efek *cooperativity*. Efek *cooperativity* dipengaruhi interaksi non-kovalen [23]. Interaksi *cooperativity* terdiri dari tiga molekul atau lebih dan yang merupakan komponen penting dari interaksi antar molekul yaitu adanya ikatan hidrogen [24]. Semakin banyak interaksi yang terbentuk dalam pembentukan *molecular recognition* antara kompleks *host* dan *guest* maka molekulnya semakin stabil dan energinya semakin negatif atau disebut *negative cooperativity*. Pada hasil docking A8 memiliki jumlah ikatan hidrogen yang paling banyak dari pada konformasi yang lainnya, dengan adanya tiga ikatan hidrogen interaksinya semakin kompleks. Secara umum, jika ditinjau dari hubungan ΔG dan K_i semakin minimum *energy binding*nya maka kemampuan ADTC3 dalam menginhibisi EC1 semakin kuat, sehingga porositas *junction* antar sel dapat diatur.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konformasi ADTC3 yang memiliki energi terendah tidak selalu berinteraksi lebih kuat dengan E-Kadherin domain EC1. Konformasi pada energi terendah adalah A1, sedangkan yang berinteraksi lebih kuat adalah konformasi A8 dengan *energy binding* sebesar -31,55 kJ/mol dengan situs ikatan pada residu Asp1, Trp2, Val3, Ile4, Lys25, Met92.

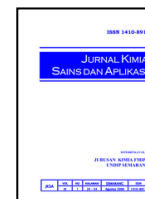
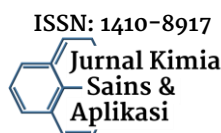
5. Acknowledgements

Terimakasih kepada Prof. Teruna J. Siahaan, Ph.D. (Departemen Kimia Farmasi Universitas Kansas, USA) yang telah memberikan masukan dan diskusi tentang penelitian dalam bidang *drug delivery* dan *drug targeting* pada sel dan sistem penghantaran obat. Terimakasih juga kepada Prof. Krzysztof Kuczera, Ph.D. (Departemen Kimia Universitas Kansas, USA) yang telah memberikan masukan dan diskusi tentang penelitian pemodelan komputasi molekul. Terimakasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi yang telah mendanai penelitian ini pada tahun 2013.

6. Referensi

- [1] Ahmed Alaofi, Elinaz Farokhi, Vivitri D. Prasasty, Asokan Anbanandam, Krzysztof Kuczera, Teruna J. Siahaan, Probing the interaction between cHAVC3 peptide and the EC1 domain of E-cadherin using NMR and molecular dynamics simulations, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35, 1, (2017) 92-104 <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2015.1133321>
- [2] Ernawati Sinaga, Seetharama D. S. Jois, Mike Avery, Irwan T. Makagiansar, Usman S. F. Tambunan, Kenneth L. Audus, Teruna J. Siahaan, Increasing Paracellular Porosity by E-Cadherin Peptides: Discovery of Bulge and Groove Regions in the EC1-Domain of E-Cadherin, *Pharmaceutical Research*, 19, 8, (2002) 1170-1179 <http://dx.doi.org/10.1023/a:1019850226631>
- [3] Karen L. Lutz, Teruna J. Siahaan, Molecular structure of the apical junction complex and its contribution to the paracellular barrier, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 9, (1997) 977-984 <http://dx.doi.org/10.1021/js970134j>
- [4] M. S. Balda, K. Matter, Tight junctions, *Journal of Cell Science*, 111, 5, (1998) 541-547
- [5] Reinhard Gabathuler, Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases, *Neurobiology of Disease*, 37, 1, (2010) 48-57 <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.028>
- [6] Marlyn D. Laksitorini, Paul K. Kiptoo, Ngoc H. On, James A. Thliveris, Donald W. Miller, Teruna J. Siahaan, Modulation of Intercellular Junctions by Cyclic-ADT Peptides as a Method to Reversibly Increase Blood-Brain Barrier Permeability, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 3, (2015) 1065-1075 <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24309>
- [7] Shinji Hirano, Masatoshi Takeichi, Cadherins in Brain Morphogenesis and Wiring, *Physiological*

- Reviews, 92, 2, (2012) 597-634
<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00014.2011>
- [8] Natalie K. Lee, Ka Wai Fok, Amanda White, Nicole H. Wilson, Conor J. O'Leary, Hayley L. Cox, Magdalene Michael, Alpha S. Yap, Helen M. Cooper, Neogenin recruitment of the WAVE regulatory complex maintains adherens junction stability and tension, *Nature Communications*, 7, (2016) 11082
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11082>
- [9] Ernawati Sinaga, Seetharama D. S. Jois, Mike Avery, Irwan Makagiansar, Usman S. F. Tambunan, Teruna J. Siahaan, Modulasi Junction Antar Sel Menggunakan Peptida Kadherin Upaya Meningkatkan Penghantaran Obat, *Makara Journal of Science*, 8, 1, (2004) 25-34
<http://dx.doi.org/10.7454/jmss.v8i1.394>
- [10] VK Mourya, Nazma N Inamdar, Ashutosh Tiwari, Carboxymethyl chitosan and its applications, *Advanced Materials Letters*, 1, 1, (2010) 11-33
<http://dx.doi.org/10.5185/amlett.2010.3108>
- [11] Jae Hyung Park, Gurusamy Saravanakumar, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1, (2010) 28-41
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.003>
- [12] Marlyn Dian Laksitorini, Design of Cyclic-ADT Peptides to Improve Drug Delivery to the Brain via Inhibition of E-Cadherin Interactions at the Adherens Junction, in: *Pharmaceutical Chemistry*, University of Kansas, 2012.
- [13] Tomasz Makarewicz, Rajmund Kaźmierkiewicz, Molecular Dynamics Simulation by GROMACS Using GUI Plugin for PyMOL, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53, 5, (2013) 1229-1234
<http://dx.doi.org/10.1021/ci400071x>
- [14] Miaoer Yu, Computational Modeling of Protein Dynamics with GROMACS and Java, in: *Computer Science*, San José State University, San José, California, 2012.
- [15] Sandeep Patel, Alexander D. Mackerell, Charles L. Brooks, CHARMM fluctuating charge force field for proteins: II Protein/solvent properties from molecular dynamics simulations using a nonadditive electrostatic model, *Journal of Computational Chemistry*, 25, 12, (2004) 1504-1514
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20077>
- [16] Garrett M. Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F. Sanner, Richard K. Belew, David S. Goodsell, Arthur J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, 30, 16, (2009) 2785-2791
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>
- [17] Garrett M Morris, David S Goodsell, Robert S Halliday, Ruth Huey, William E Hart, Richard K Belew, Arthur J Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of computational chemistry*, 19, 14, (1998) 1639-1662
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- [18] Parsaoran Siahaan, Vivitri Dewi Prasasty, Bungaran David Simanjuntak, Suci Hildayani, Khairul Anam, Structural Stability of ADTC5 Peptide: Conformational Insights into Dynamics and Its Binding Mode, *Journal of Tropical Life Science*, 7, 2, (2017) 151-157
- [19] Ken A. Dill, Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, 29, 31, (1990) 7133-7155
<http://dx.doi.org/10.1021/bi00483a001>
- [20] Leonardo Ferreira, Ricardo dos Santos, Glaucius Oliva, Adriano Andricopulo, *Molecular docking and Structure-Based Drug Design Strategies*, *Molecules*, 20, 7, (2015) 13384
- [21] Emilio Parisini, Jonathan M. G. Higgins, Jin-huan Liu, Michael B. Brenner, Jia-huai Wang, The Crystal Structure of Human E-cadherin Domains 1 and 2, and Comparison with other Cadherins in the Context of Adhesion Mechanism, *Journal of Molecular Biology*, 373, 2, (2007) 401-411
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.011>
- [22] P. Archana, N. Sathishkumar, N. Bharathi, In silico docking analysis of curcumin - an inhibitor for obesity, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 4, (2010) B-235
- [23] Xavier Lucas, Antonio Bauza, Antonio Frontera, David Quinonero, A thorough anion-[small pi] interaction study in biomolecules: on the importance of cooperativity effects, *Chemical Science*, 7, 2, (2016) 1038-1050
<http://dx.doi.org/10.1039/C5SC01386K>
- [24] Asit K. Chandra, Therese Zeegers-Huyskens, Theoretical Investigation of the Cooperativity in CH₃CHO.2H₂O, CH₂FCHO.2H₂O, and CH₃CFO.2H₂O Systems, *Journal of Atomic, Molecular & Optical Physics*, (2012) 1-8
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/754879>



Pengaruh Garam Monovalen (NaCl dan KCl) dan Divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura

Siti Anisa^a, Nies Suci Mulyani^a, Mukhammad Asy'ari^{a,*}

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: asyari@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: halophilic bacteria, halostable proteases, <i>bittern</i>, monovalence and divalence salts</p>	<p>Halophilic bacteria grows and survives on the environment with high salinity value, for example is the <i>bittern</i>. Halophilic bacteria can produce enzymes which resist to salt, one of the enzyme is halostable proteases. The halostable proteases can be used to waste degradation process on the saline area. This research is to get the extracellular proteases from halophilic bacteria isolated from <i>bittern</i> at Madura salt pond and to determine the effect of monovalence salts (NaCl and KCl) and divalence salts (CaCl₂ and MgCl₂) in activity and its profile activity of proteases halostable. Based on this experiment, it is found that protease halostable has the highest activity in the first fraction (0–20%) with the specific activity about 220,83 unit/mg of protein. The present of salts such as NaCl, CaCl₂ and MgCl₂ increase the proteases activity, while KCl decreases the protease activity. The effect of salt addition to protease activity is increasing in KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂ respectively.</p>
<p>Kata kunci: bakteri halofilik, protease halostabil, <i>bittern</i>, garam monovalen dan divalen</p>	<p>Abstrak</p> <p>Bakteri halofilik mampu tumbuh dan bertahan hidup pada lingkungan dengan kadar garam tinggi, seperti dalam air pekatan sisa tambak garam (<i>bittern</i>). Bakteri halofilik dapat menghasilkan enzim protease yang tahan terhadap garam (halostabil). Protease halostabil dapat dimanfaatkan pada proses degradasi limbah pada kawasan yang mengandung garam. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protease ekstraseluler bakteri halofilik isolat <i>bittern</i> tambak garam Madura dan menentukan pengaruh garam monovalen (NaCl dan KCl) dan divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas dan profil aktivitas protease halostabil. Berdasarkan penelitian diperoleh protease halostabil memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi 1 (0–20%) sebesar 220,83 Unit/mg protein. Pengaruh garam NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂ akan cenderung meningkatkan aktivitas proteasenya sebaliknya KCl akan menurunkan aktivitas protease. Profil pengaruh penambahan garam terhadap aktivitas protease semakin meningkat sesuai dengan urutan KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂.</p>

1. Pendahuluan

Bakteri halofilik merupakan jenis bakteri yang membutuhkan konsentrasi garam tinggi untuk tumbuh dan bertahan hidup [1]. Salah satu habitat bakteri halofilik adalah di dalam pekatan air garam yang biasa

disebut *bittern* [2, 3]. Bakteri ini mampu menghasilkan enzim hidrolitik yang salah satunya adalah protease. Protease berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan peptida protein menjadi oligopeptida dan asam – asam amino [4]. Protease halostabil dapat dimanfaatkan

pada degradasi limbah pada kawasan yang mengandung garam [1].

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi protease bakteri halofilik-alkalofilik dari habitat yang mengandung kadar garam sedang di wilayah Coastal Gujarat, India. Bakteri halofilik-alkalofilik ditumbuhkan pada media *Enrichment Halophile Broth* (EHB) dengan konsentrasi NaCl 10% [3]. Norberg dan Hofsten [5] juga berhasil mengisolasi protease dari *Halobacterium Salinarum sp* hasil fermentasi saus ikan yang ditumbuhkan pada media M73 dengan menggunakan substrat azokasein.

Aktivitas protease halostabil dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah adanya garam [6, 7]. Kation dari garam akan mempertahankan kestabilan struktur protease halostabil. Penstabilan struktur protein terjadi melalui ikatan antara kation garam dengan muatan-muatan negatif pada permukaan protein [1]. Selain itu, adanya kation juga dapat memberikan efek perlindungan (*shielding effect*) protein terhadap pengaruh kondisi lingkungannya [1]. Pada konsentrasi garam NaCl (3,4 M), CaCl₂ (100 mM) dan MgCl₂ (1mM) dapat meningkatkan aktivitas protease serin ekstraseluler dari bakteri *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 sebesar 100%, 121%, dan 62% [8]. Kation-kation lain yang diketahui dapat mempengaruhi aktivitas enzim adalah K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, dan Ni²⁺ [8]. Pada umumnya ion-ion ditambahkan dalam bentuk garamnya.

Berdasarkan terdahulu diketahui bahwa kestabilan enzim bakteri halofilik dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi garamnya [1, 8]. Sehingga dalam penelitian ini perlu dilakukan penentuan pengaruh jenis garam yaitu garam monovalen (NaCl dan KCl) dan divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas dan profil aktivitas protease ekstraseluler bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura.

2. Metode Penelitian

Sampel stok bakteri halofilik koloni tunggal isolat *bittern* tambak garam Madura.

Pembuatan Artificial Sea Water (ASW)

Sebanyak 2,4 g NaCl; 1,1g MgCl₂.6H₂O; 0,2 g Na₂SO₄; 0,07 g KCl; 0,02 g NaHCO₃; 0,01 g KBr; 4,0 mg SrCl₂.6H₂O; 0,5 mg Na₂SiO₃.9H₂O; 0,3 mg NaF kemudian diencerkan kedalam 100 mL aquades

Pembuatan Media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Sebanyak 1 g glukosa; 0,5 g tripton; 0,5 g ekstrak ragi; 0,5 g NaHPO₄; 10 g NaCl; 10 mL ASW dan diencerkan kedalam 100 mL aquades kemudian di autoklaf.

Peremajaan Isolat Bakteri Halofilik pada Media *Enrichment Halophile Broth* (EHB)

Proses peremajaan dilakukan terhadap stok bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura. Bakteri koloni tunggal tersebut ditumbuhkan pada media

Enrichment Halophile Broth (EHB) agar diperoleh kultur bakteri pada kondisi yang aktif. Pada media ini terdapat bittern untuk pengkondisian lingkungan alamiah dari bakteri halofilik yaitu pada kadar garam tinggi. Selain itu juga diberikan bahan tambahan sebagai nutrisi seperti glukosa, tripton, ekstrak ragi, KH₂PO₄, dan NaCl 10% yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Penginkubasian dilakukan selama 24 jam pada 250 rpm dan 37°C. Kekekruhan pada media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.

Adaptasi bakteri pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Sebanyak 10 µL stok bakteri halofilik hasil peremajaan pada media EHB ditumbuhkan ke dalam 100 mL media HSB [9]. Penginkubasian dilakukan pada 250 rpm dan temperatur 37°C selama 24 jam. Kekekruhan pada media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri halofilik.

Uji morfologi dan pewarnaan gram

Sebanyak 2-3 tetes kultur bakteri halofilik diteteskan di atas slide mikroskop yang sudah disterilkan dengan alkohol. Slide kemudian dikeringkan dengan melewati di atas api dan mengangin-anginkannya sehingga diperoleh preparat. Sebanyak 2-3 tetes larutan kristal ungu ditambahkan ke dalam preparat dan diamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan akuades dan diangin-anginkan sampai kering. Tambahkan 1 tetes reagen gram's iodine dan diamkan selama 1 menit. Setelah itu preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Larutan alkohol-aseton ditambahkan sebanyak 2 tetes. Setelah pendiaman 2-3 menit preparat dibilas dengan air kemudian ditambahkan 1 tetes safranin dan diamkan selama 30 detik. Pengamatan morfologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1500x [10].

Produksi, Isolasi dan Pemurnian Protease Halostabil

Sebanyak 200 µL kultur hasil peremajaan diinokulasikan ke dalam 1 L media HSB dan diinkubasi dalam shaker inkubator pada 250 rpm, 37°C selama 32 jam dan penambahan inducer kasein setelah 12 jam. Kemudian diisolasi enzim ekstraselulernya. Enzim ekstraseluler kemudian dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat bertingkat dan dilanjutkan dengan dialisis.

Uji aktivitas enzim

Penentuan aktivitas protease

Untuk larutan sampel, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 mM pH 8 ditambahkan aquades 0,625 mL dan dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit dalam *shaker water bath inkubator*, kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu 37°C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*. Setelah itu ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10%. Campuran dikocok dan didiamkan didalam air es. Untuk larutan blanko (t₀), sebanyak 2,25 mL Bufer fosfat 0,05 mM pH 8 ditambahkan dengan aquades 0,625 mL dicampurkan

dengan 0,125 mL larutan azokasein 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*, setelah itu ditambahkan 1,5 mL TCA 10% dan 0,5 mL larutan enzim yang sudah dimatikan dengan cara pemanasan. Campuran dikocok dan didiamkan didalam es. Larutan blanko dan larutan sampel disentrifus pada 6000 rpm selama 30 menit. Masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada 440 nm [11, 12].

Pengaruh garam NaCl, KCl, CaCl₂, dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease

Penambahan larutan garam NaCl, KCl, CaCl₂, dan MgCl₂ dengan variasi konsentrasi 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 mM. Setelah itu dilakukan pengukuran aktivitas pada sampel dan blankonya.

3. Hasil dan Pembahasan

Adaptasi Bakteri Halofilik pada Media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Bakteri halofilik koloni tunggal dari *bittern* tambak garam Madura ditumbuhkan pada media *Enrichment Halophile Broth* (EHB) agar diperoleh kultur bakteri pada kondisi yang aktif kemudian diadaptasikan pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB). Komposisi media HSB dibuat mirip dengan media EHB. Namun pada media HSB, digunakan *artificial sea water* (ASW) sebagai pengganti *bittern*. Komposisi mineral yang terkandung di dalamnya dibuat mirip seperti komposisi *bittern*.

Proses adaptasi pertumbuhan bakteri halofilik dilakukan secara bertahap sampai semua *bittern* dalam media dapat digantikan dengan ASW. Keberhasilan pertumbuhan bakteri pada media HSB ditunjukkan oleh adanya kekeruhan pada media. Bakteri yang tumbuh selanjutnya dilakukan uji morfologi dan pewarnaan gram [13, 14], untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh pada media HSB sama dengan bakteri halofilik stok awal. Berdasarkan penelitian diperoleh bakteri halofilik berbentuk kokus dan bersifat gram negatif sama dengan bakteri stok awal.

Produksi Enzim Protease halostabil

Produksi enzim protease dari bakteri halofilik dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri halofilik pada media HSB kemudian diinkubasi selama 32 jam sesuai dengan kurva pertumbuhan bakteri halofilik dan ditambahkan induser kasein setelah inkubasi 24 jam. Protease diisolasi dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Kemudian diambil supernatannya yang merupakan enzim ekstrak kasar yang selanjutnya dilakukan proses pemurnian protease.

Pemurnian Protease Halostabil

Pemurnian enzim dilakukan dengan cara fraksinasi amonium sulfat bertingkat dilanjutkan dengan dialisis. Enzim ekstrak kasar yang diperoleh dimurnikan dengan mengendapkan protein menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan berbeda untuk memisahkan protein enzim dari protein lainnya sehingga diperoleh fraksi-fraksi protein [15, 16]. Cara

ini berdasarkan prinsip *salting out*. Proses pemurnian berikutnya adalah dialisis menggunakan membran selofan dengan perbedaan konsentrasi bufer fosfat di luar dan di dalam membran 0,05x10⁻²M dan 0,05M hingga semua garam amonium sulfat terbebaskan.

Penentuan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Protease halostabil

Protease halostabil hasil isolasi ditentukan aktivitasnya dengan mereaksikan enzim tersebut menggunakan substrat azokasein. Penentuan aktivitas protease halostabil dilakukan melalui identifikasi bertambahnya produk hasil hidrolisis azokasein. Degradasi dari azokasein akan membebaskan warna yang terikat pada azokasein sehingga dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 440nm. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis azokasein sehingga menghasilkan perubahan absorbansi sebesar 1% per mL pada panjang gelombang 440 nm pada kondisi percobaan [12]. Kemudian ditentukan kadar protein pada tiap fraksi dengan metode Lowry dan dihitung aktivitas spesifiknya.

Tabel 1 hasil uji aktivitas dan aktivitas spesifik protease

Fraksi enzim	Aktivitas enzim (unit/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (Unit/mg protein)
(EK)	4,5	0,080	56,25
F 1	5,3	0,024	220,83
F 2	6,3	0,070	90,57
F 3	4,7	0,106	44,34
F 4	4,1	0,100	41,00
F 5	4,2	0,069	60,87

Berdasarkan tabel 1, aktivitas spesifik tertinggi protease halostabil pada fraksi F1 (0-20%) sebesar 209,2 unit/mg protein. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi protease pada F1 lebih tinggi dibandingkan fraksi enzim yang lain.

Pengaruh Garam Terhadap Aktivitas Protease Halostabil

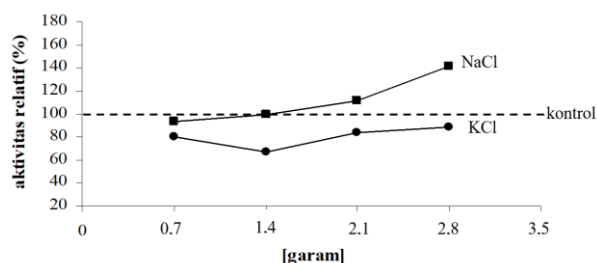
Penentuan pengaruh garam terhadap aktivitas protease halostabil dilakukan dengan menentukan aktivitas protease dengan penambahan berbagai garam dengan variasi konsentrasi tertentu, kemudian dibandingkan dengan aktivitas protease halostabil tanpa penambahan garam (kontrol). Garam yang ditambahkan yaitu garam monovalen NaCl dan KCl dan garam divalen MgCl₂ dan CaCl₂ dengan variasi konsentrasi 0,7 mM; 1,4 mM; 2,1 mM, dan 2,8 mM.

Pengaruh penambahan garam monovalen NaCl dan KCl terhadap aktivitas protease halostabil

NaCl dan KCl merupakan garam monovalen yang kationnya mempunyai muatan +1. Kation pada garam akan berikatan dengan gugus-gugus asam (muatan negatif) pada permukaan enzim sehingga struktur

enzim menjadi lebih stabil dan akan berpengaruh terhadap aktivitasnya. Garam NaCl dan KCl memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas protease halostabil. Pada konsentrasi yang sama, NaCl cenderung meningkatkan aktivitas protease halostabil sedangkan KCl akan menurunkan aktivitas (Gambar 1).

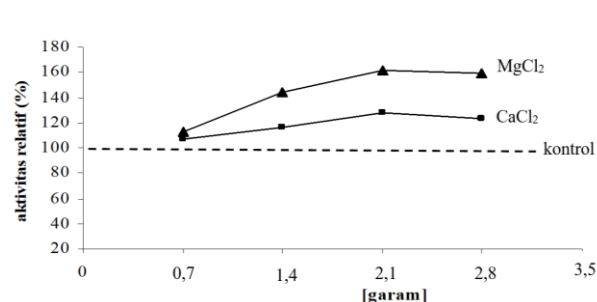
Penurunan aktivitas protease halostabil pada penambahan K⁺ ini dikarenakan ikatan antara muatan negatif pada permukaan enzim dengan ion K⁺ lebih lemah dibandingkan ikatan dengan ion Na⁺. Hal ini dikarenakan tarikan muatan inti dari K⁺ lebih lemah sehingga ikatan antara K⁺ dengan anion lebih mudah lepas. Jari-jari ion K⁺ yang besar juga menyebabkan ukuran ion K⁺ semakin besar sehingga berpengaruh pada banyaknya muatan negatif yang mampu dinetralkan oleh kation tersebut. Pada konsentrasi garam yang sama, muatan negatif pada permukaan protease halostabil yang dinetralkan oleh ion K⁺ lebih sedikit (dibandingkan oleh ion Na⁺), sehingga struktur menjadi kurang stabil dan aktivitasnya menurun.



Gambar 1 Profil pengaruh penambahan garam monovalen NaCl dan KCl terhadap aktivitas protease halostabil.

Pengaruh penambahan garam divalen CaCl₂ dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease halostabil

Garam divalen: CaCl₂ dan MgCl₂ memiliki muatan positif lebih banyak daripada monovalen. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan garam divalen dapat meningkatkan aktivitas protease halostabil dan mencapai konsentrasi optimum pada 2,1 mM (Gambar 2).



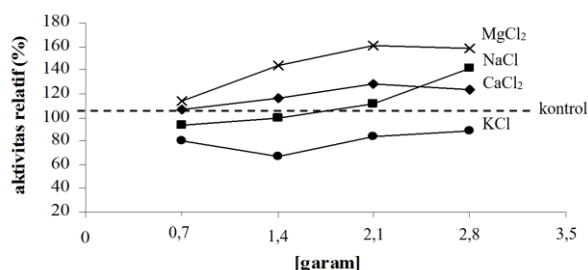
Gambar 2 Profil pengaruh penambahan CaCl₂ dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease halostabil

Pada konsentrasi yang sama, garam monovalen dan divalen memiliki profil aktivitas relatif yang mirip. Keunikan terjadi pada penambahan garam MgCl₂ yaitu dapat meningkatkan aktivitas protease lebih tinggi dibandingkan CaCl₂. Hal ini dikarenakan ikatan antara ion Mg²⁺ dengan muatan negatif pada permukaan

protease lebih kuat dibandingkan dengan ion Ca²⁺. Ion Mg²⁺ mempunyai jari-jari ion lebih kecil daripada Ca²⁺ sehingga tarikan muatan intinya lebih kuat. Sebaliknya, ikatan ion Ca²⁺ dengan muatan negatif permukaan protease lebih lemah sehingga akan menyebabkan ikatan lebih mudah lepas dan membuat struktur protease menjadi kurang stabil.

Pengaruh penambahan garam monovalen (NaCl dan KCl), dan garam divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas protease halostabil

Pengaruh penambahan garam monovalen dan divalen dengan berbagai konsentrasi secara umum memperlihatkan profil aktivitas yang sama terhadap kontrol (Gambar 3). Penambahan garam NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂ menunjukkan profil aktivitas protease meningkat, sedangkan KCl profil aktivitasnya menurun. Peningkatan aktivitas paling tinggi pada penambahan MgCl₂.



Gambar 3 Profil pengaruh penambahan berbagai garam terhadap aktivitas protease

Garam monovalen NaCl dan KCl memiliki muatan kation lebih sedikit dibandingkan garam divalen CaCl₂ dan MgCl₂ sehingga pada konsentrasi yang sama, anion pada permukaan enzim yang ternetralkan oleh ion Na⁺ maupun ion K⁺ akan lebih sedikit. Konsentrasi garam untuk uji aktivitas adalah 0,7 - 2,8 mM yang didasarkan pada rentang konsentrasi optimal CaCl₂ dan MgCl₂.

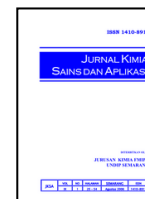
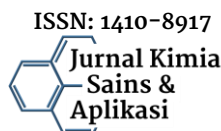
Pengaruh variasi konsentrasi NaCl terhadap aktivitas protease menunjukkan profil yang linear. yaitu dengan semakin tinggi konsentrasi NaCl semakin tinggi pula aktivitasnya. Perbedaan linearitas profil [konsentrasi garam-aktivitas] antara garam NaCl, KCl, MgCl₂ dan CaCl₂ menunjukkan bahwa pola adaptasi protease halostabil terhadap NaCl lebih baik daripada garam lainnya. Hal ini diprediksi berkaitan dengan kondisi alami dari bakteri halofilik yang mampu hidup pada konsentrasi garam NaCl tinggi.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh protease ekstraseluler dari bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura memiliki aktivitas spesifik 220,83 unit/mg protein pada fraksi 1 (0-20%). Pengaruh penambahan garam NaCl, CaCl₂, dan MgCl₂ dapat meningkatkan aktivitas protease halostabil, sedangkan penambahan KCl cenderung menurunkan aktivitas protease halostabil. Profil aktivitas protease halostabil semakin meningkat sesuai dengan urutan KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂.

5. Daftar Pustaka

- [1] Aharon Oren, *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Springer Science & Business Media, 2002.
- [2] Shiladitya DasSarma, Priya DasSarma, *Halophiles*, in: *Encyclopedia of Life Science*, Wiley, 2006.
- [3] Mital S. Dodia, Rupal H. Joshi, Rajesh K. Patel, Satya P. Singh, Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of coastal Gujarat, India, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, (2006) 276–282
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000300015>
- [4] Neil D. Rawlings, *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*, in: K. Brix, W. Stöcker (Eds.) *Proteases: Structure and Function*, Springer Vienna, Vienna, 2013, pp. 1–36.
- [5] P. Norberg, B. V. Hofsten, *Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria*, *Microbiology*, 55, 2, (1969) 251–256
<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-55-2-251>
- [6] Janos K. Lanyi, Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria, *Bacteriological Reviews*, 38, 3, (1974) 272–290
- [7] Janos K. Lanyi, Joann Stevenson, Studies of the Electron Transport Chain of Extremely Halophilic Bacteria: IV. Role of Hydrophobic Forces in The Structure of Menadione Reductase, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 16, (1970) 4074–4080
- [8] Malashetty Vidyasagar, S Prakash, Carol Litchfield, K Sreeramulu, Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101, *Archaea*, 2, 1, (2006) 51–57
- [9] Ronald M. Atlas, Richard Bartha, *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 3 ed., Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993.
- [10] John P. Harley, Lansing M. Prescott, *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5 ed., McGraw–Hill, 2001.
- [11] Werasit Kanlayakrit, Preeyanuch Bovornreungroj, Takuji Oka, Masatoshi Goto, Production and characterization of protease from an extremely halophilic *Halobacterium* sp. PB407, *Kasetsart Journal: Natural Science*, 38, 5, (2004) 15–20
- [12] J. Charney, R. M. Tomarelli, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *Journal of Biological Chemistry*, 171, (1947) 501–505
- [13] Terry J. Beveridge, Structures of Gram–Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles, *Journal of Bacteriology*, 181, 16, (1999) 4725–4733
- [14] R. McClelland, Gram's stain: the key to microbiology, *MLO Med Lab Obs*, 33, 4, (2001) 20–22, 25–28; quiz 30–21
- [15] Clive Dennison, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [16] Tim Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, John Wiley & Sons, 2004.



Pengaruh Pemerangkapan Enzim Alkalin Fosfatase ke dalam Silika dari Abu Sekam Padi terhadap Aktivitas Enzimatiknya

Sriyanti^{a,*}

^a Inorganic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: sriyanti@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:

Alkaline phosphatase, RHA, entrapment, silica, enzyme.

Kata kunci:

Alkalin fosfatase, abu sekam padi, pemerangkapan, silika, enzim.

Abstract

Alkaline phosphatase was entrapment in silica from rice hull ash by sol-gel process. In this procedure, silica solution was extracted from rice hull ash (RHA) by 1.5 N of sodium hydroxide. The 0.1 N of hydrochloride acid solution was added to decrease pH until 10. Alakline phosphatase (in tris-HCl buffer solution at pH: 8) was added to silica solution, placed in desicator until gel formed. Dry gel formed was immobilized enzyme. The catalytic properties and kinetic parameters both free enzyme in solution and immobilized enzyme was studied. Results showed that the optimal pH and temperature for the immobilized alkaline phosphatase in silica were 9.0 and 45°C, which were higher than those of the free form (8.5 and 40°C). It was found, at room temperature and pH 8.5, that the Michaelis-Menten constant (K_m) was 7.50 mM and that specific activity was 0.051 U/mg enzyme for entrapment alkaline fosfatase, compared to a K_m of 0.08 mM and specific activity 1.041 U/mg enzyme for free the alkaline phosphatase.

Abstrak

Alkalin fosfatase telah diperangkap ke dalam silika dari abu sekam padi melalui proses sol-gel. Dalam prosedur ini, larutan silika dihasilkan melalui ekstraksi abu sekam padi menggunakan larutan natrium hidroksida 1,5 N. Larutan asam klorida 0,1 N ditambahkan untuk menurunkan pH larutan silika hingga 10. Alkalin fosfatase (dalam larutan buffer tris-HCl pH:8) ditambahkan ke dalam larutan silika, didiamkan di dalam desikator hingga terbentuk gel. Gel kering merupakan enzim terperangkap (terenkapsulasi). Parameter katalitik dan kinetik ditentukan baik untuk enzim bebas dalam larutan maupun untuk enzim terimobilisasi. Hasil menunjukkan bahwa pH dan suhu optimal untuk alkalin fosfatase terimobilisasi dalam silika adalah 9,0 dan 45°C, lebih tinggi dibandingkan dengan bentuk bebasnya (8,5 dan 40°C). Pada suhu kamar dan pH 8,5, konstanta Michaelis-Menten (K_m) adalah 7,50 mM dan aktivitas spesifiknya adalah 0,051 U/mg enzim untuk alkalin fosfatase terenkapsulasi, sedangkan untuk alkalin fosfatase bebas dalam larutan berturut-turut 0,08 mM dan 1,041 U/mg enzim.

1. Pendahuluan

Enzim adalah biokatalis yang diproduksi oleh jaringan hidup untuk meningkatkan laju reaksi yang terjadi dalam jaringan. Enzim mengkatalisis hampir semua reaksi-reaksi biologis penting. Dewasa ini penggunaan enzim sebagai biosensor untuk uji klinik

dalam mendeteksi berbagai penyakit semakin banyak digunakan, selain di bidang industri [1]

Alkalin fosfatase (E.C. 3.1.3.1) atau Ortofosforik monoester fosfohidrolase adalah enzim yang mengkatalisis perubahan fosfat organik menjadi fosfat anorganik. Dalam bidang kedokteran digunakan sebagai biosensor untuk mendiagnosa penyakit liver dan tulang

[1]. Dalam bidang industri digunakan untuk menguji produk susu dan air minum [2].

Permasalahan umum yang timbul pada pemakaian enzim adalah ketidakstabilan enzim yaitu mudah rusak selama penyimpanan dan tidak tahan terhadap panas maupun kondisi keasaman (pH) tertentu. Selain itu, sebagai katalis reaksi yang akan terbentuk kembali bersama produk, ternyata tidak mudah untuk dipisahkan dari produknya sehingga tidak dapat digunakan secara berulang. Untuk menjaga kestabilan enzim, biasanya dilakukan dengan mengimobilkan pada media tertentu seperti membrane, selulose atau silika [1].

Imobilisasi enzim melalui pemerangkapan (enkapsulasi) sol-gel ini berkembang dengan pesat. Silika banyak digunakan sebagai prekursor karena stabil dalam berbagai kondisi, mempunyai kestabilan termal yang tinggi, tidak mengembang (*swelling*), inert dan transparan secara optis [3]. Enzim Kloroperoksidase telah berhasil diperangkap dalam TEOS dengan mempertahankan aktivitasnya [4]. Natrium silikat dapat digunakan sebagai prekursor dalam proses sol-gel karena mudah mengalami hidrolisis dan kondensasi pada keadaan tertentu [5] Natrium silikat dapat dihasilkan dari ekstraksi abu sekam padi menggunakan natrium hidroksida atau karbonat [6]

Sebagai negara agraris, sejak tahun 1999 Indonesia dapat memproduksi padi sekitar 50 juta ton pertahun. Padi sejumlah itu dapat menghasilkan abu sekam sekitar 1-3 juta ton, yang sejauh ini belum dapat dimanfaatkan secara optimal. Ekstraksi silika dari abu sekam padi dapat dilakukan dengan metode basah menggunakan larutan natrium hidroksida mendidih [6]. Hasil ekstraksi yang berupa natrium silikat telah digunakan sebagai prekursor dalam pembuatan silika xerogel dengan kemurnian yang tinggi melalui metode sol-gel [6, 7]. Metode sol-gel diawali dengan reaksi hidrolisis fasa sol untuk selanjutnya mengalami kondensasi membentuk polimer menuju gel [8].

Dalam penelitian ini dikaji pengaruh imobilisasi sol-gel alkalin fosfatase ke dalam natrium silikat hasil ekstraksi dari abu sekam padi terhadap sifat-sifat katalitik dan kinetiknya.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari: Alkalin fosfatase (ALP) dari *bovine intestinal mucosa*, para-Nitrofenil fosfat, para-Nitrofenol, buffer Tris-HCl (Sigma), magnesium klorida, natrium hidroksida dan Asam klorida (Merck), sedangkan peralatan utama yang digunakan adalah hotplate, sentrifuge, shaker, spektrometri-20, FTIR dan XRD.

Ekstraksi silika dari abu sekam padi

Sekam padi dari daerah Sragen, Jawa Tengah, dikeringkan di bawah matahari dan dibersihkan dari kotoran-kotoran pengikut seperti daun-daun padi, pasir dan kerikil. Selanjutnya dipanaskan di atas kompor

hingga membentuk arang yang berwarna hitam. Arang dimasukkan ke dalam cawan porselen untuk selanjutnya dipanaskan dalam tungku pemanas (*furnace*) selama 4 jam dengan temperatur 700°C. Abu yang dihasilkan digerus kemudian diayak hingga lolos ayakan 200 mesh.

Larutan natrium silikat dibuat dengan melarutkan abu sekam dengan larutan NaOH mendidih (ekstraksi) mengikuti metode terdahulu [6]. Dibuat larutan NaOH 1,5 N dari NaOH pelet yang ada. Enampuluh mililiter larutan NaOH 1,5 N ditambahkan ke dalam 10 g abu sekam, kemudian dididihkan sambil diaduk. Setelah dingin disaring, dan residu ditambah lagi dengan 60 mL larutan NaOH 1,5 N dan kembali dididihkan setelah dingin, disaring dan filtratnya disatukan dengan filtrat pertama sebagai larutan natrium silikat dan disimpan dalam botol plastik.

Pembuatan silika gel dari silika terlarut hasil ekstraksi dari abu sekam padi

Dibuat silika gel dengan menambahkan (0,5-5 mL) HCl 0,1 N pada (3,4 mL) silikat terlarut hingga terbentuk gel. Setelah dikeringkan diuji tingkat kekristalannya dengan XRD dan jenis-jenis gugus fungsinya dengan FTIR.

Imobilisasi sol-gel alkalin fosfatase dalam silika terlarut

Mengacu pada metode Wei *dkk.* [9] dengan berbagai penyesuaian. Setelah penambahan HCl 0,1 N pada silikat terlarut dengan perbandingan tertentu, selanjutnya ditambahkan 0,04 mL enzim ALP yang sudah dilarutkan dalam buffer Tris-HCl (2 mg ALP dalam 40 mL buffer, pH: 8). Sesudah terbentuk gel, ditutup dengan parafilm yang diberi beberapa lobang untuk menguapkan pelarutnya dan dibiarkan semalam. Sampel kemudian diletakkan dalam desikator vakum dan disimpan selama beberapa hari hingga dipeoleh berat konstan. Sampel dibuat puder dan selanjutnya disimpan dalam freezer. Karakterisasi meliputi uji fisik, yaitu identifikasi gugus fungsional dengan FTIR, dan tingkat kekristalan dengan XRD, sedangkan uji kimiawi meliputi uji aktivitas enzimatik baik ALP bebas dalam larutan maupun ALP terenkapsulasi.

Uji aktivitas ALP bebas [10]

Satu mililiter larutan enzim (mengandung 2 µg ALP) dicampur dengan 1,46 mL buffer Tris-HCl dan 0,3 mL MgCl₂ dalam mixer vortex. Sesudah 30 menit ditambahkan 0,24 mL paranitrofenil fosfat (pNPP) 0,1 M sebagai substrat untuk memulai reaksi. Pembentukan produk para nitrofenol ditandai dengan perubahan warna diukur dengan spektrometri-20. Selanjutnya dicatat perubahan absorbansi terhadap waktu. Uji kinetika dilakukan dengan membuat plot terhadap persamaan Lineweaver-Burk, dengan memvariasi konsentrasi pNPP antara 1-15 mM:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

diperoleh harga V_{maks} dan K_m dari ALP, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik enzim dengan persamaan:

$$V_{maks} = kpEo$$

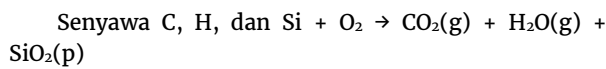
Uji aktivitas ALP terenkapsulasi [9]

Dua-sepuluh (2-10) miligram sampel yang biasanya mengandung 0,08 unit ALP diekstraksi dengan 5 ml aquabides selama 1 jam kemudian diikuti dengan sentrifugasi dan pemisahan dari fasa air. Selanjutnya dilakukan uji seperti ALP bebas dengan mengganti larutan enzim dengan 1 mL H₂O.

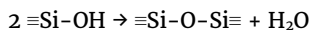
3. Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini diawali dengan pembuatan larutan natrium silikat melalui ekstraksi dengan menggunakan larutan NaOH 1,5 N. Secara keseluruhan pembuatan larutan natrium silikat (silikat terlarut) tersebut kemungkinan melibatkan reaksi kimia berikut:

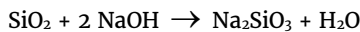
Pengabuan [11]:



Dimungkinkan juga terjadi kondensasi gugus silanol (≡Si-OH) seperti penjelasan Iler [12]:



Pada ekstraksi silika dari abu sekam hingga terbentuk larutan natrium silikat mengikuti reaksi sebagai berikut:



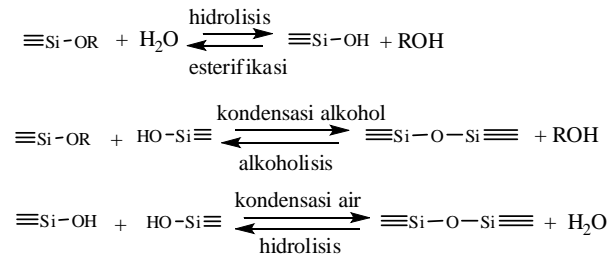
Sebelum digunakan sebagai matriks atau padatan pendukung dalam imobilisasi sol-gel (enkapsulasi) enzim ALP, dilakukan terlebih dahulu pembuatan gel dari natrium silikat hasil ekstraksi ini untuk melihat karakteristik gel yang dihasilkan. Pada umumnya, penambahan asam terhadap natrium silikat akan menyebabkan pembentukan gel secara langsung [13]. Peristiwa ini tidak dikehendaki karena dimungkinkan akan merusak enzim yang dienkapsulasikan. Untuk itu dilakukan variasi volume HCl 0,1 N yang digunakan hingga diperoleh gel yang tidak langsung terbentuk. Pengaruh volume HCl terhadap waktu pembentukan gel (gelasi) ditampilkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh volume HCl terhadap pH larutan dan waktu gelasi

No.	Volume Silikat terlarut (mL)	Volume HCl 0,1 N (mL)	pH	Waktu gelasi
1.	5	5	2	Langsung terbentuk gel
2.	5	4	3	Langsung terbentuk gel
3.	5	3	10	1 menit
4.	5	2	10	4 jam
5.	5	1	11	Tidak terbentuk gel
6.	5	0,5	12	Tidak terbentuk gel
7.	5	0,25	12	Tidak terbentuk gel

Dari tabel 1 terlihat bahwa variasi keempat (5 mL silikat terlarut dengan 2 mL HCl 0,1 N) membentuk gel dalam waktu relatif lama serta pH relatif tinggi. Selanjutnya komposisi ini digunakan pada enkapsulasi enzim.

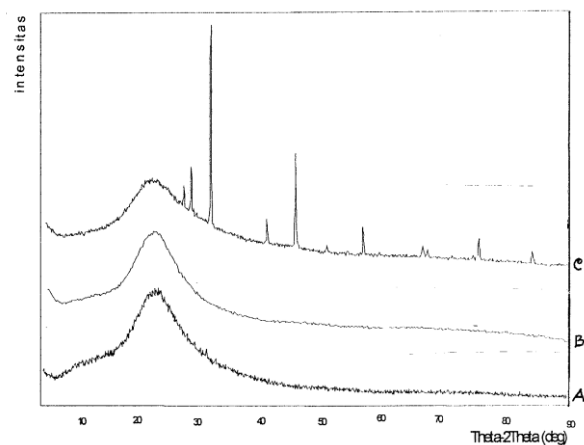
Secara umum reaksi sol-gel (pada pembentukan gel) terdiri dari dua langkah, yaitu hidrolisis logam alkoksida untuk memproduksi gugus hidroksil, diikuti dengan polikondensasi gugus hidroksil dengan sisa gugus alkoksida untuk membentuk jaringan tiga dimensi [8].



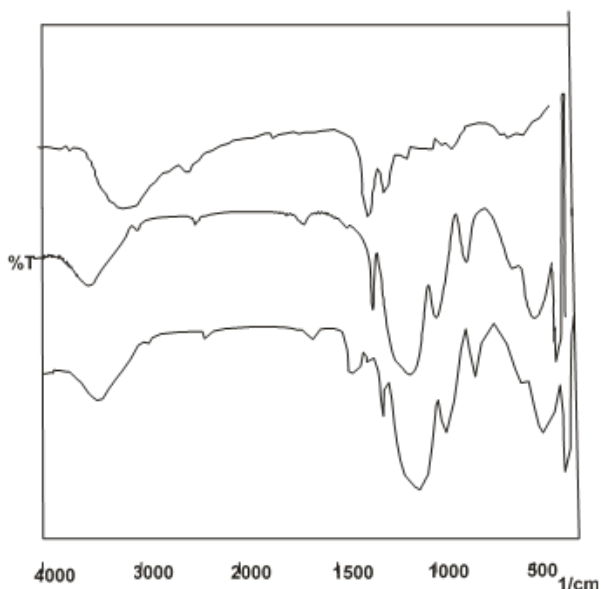
Gambar 1. Reaksi hidrolisis dan kondensasi pada proses sol-gel

Jika pada saat gel terbentuk ditambahkan molekul organik maupun biomolekul, maka molekul tersebut akan terperangkap di dalam gel. Untuk tujuan imobilisasi diharapkan pemerangkapan tersebut tidak menghilangkan keaktifan dari biomolekul yang terperangkap.

Pengaruh enkapsulasi ALP ke dalam silika diamati secara fisik maupun kimiawi. Secara fisik silika diuji tingkat kekristalannya dengan XRD (gambar 2) dan gugus-gugus fungsinya dengan FTIR (Gambar 3). Dari gambar 2 terlihat bahwa, silika dari abu sekam padi bersifat amorf. Sifat amorf ini yang menyebabkan silika bersifat reaktif, sedangkan dari gambar 3 terlihat bahwa spektra FTIR dari silika gel dari abu sekam padi maupun SG-ALP tidak menunjukkan pola yang berbeda, hal ini kemungkinan mengindikasikan bahwa enzim hanya terperangkap secara fisik, tidak membentuk suatu ikatan kimia.

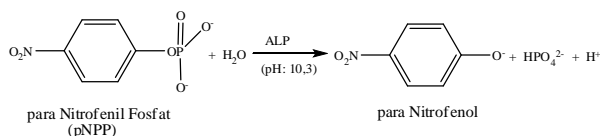


Gambar 2. Difraktogram XRD dari silika gel yang dihasilkan pada (a) pH=7 (b) pH=5 dan (c) pH=3



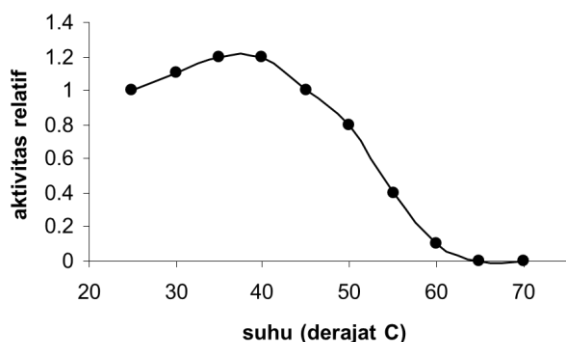
Gambar 3. Spektra FTIR dari silika gel: A. Avidin (protein), B. Silika gel dari abu sekam padi, C. Silika gel-ALP.

Uji secara kimiawi meliputi sifat katalitik dan kinetik dari enzim alkalin fosfatase. Sifat katalitik dari ALP diamati dari reaksi substrat para nitrofenil fosfat (pNPP) yang akan berubah menjadi fosfat anorganik dan para nitrofenol. Aktivitas enzimatik diukur dari terbentuknya produk paranitrofenol yang berwarna kuning dengan panjang gelombang 405 nm, seperti reaksi berikut:

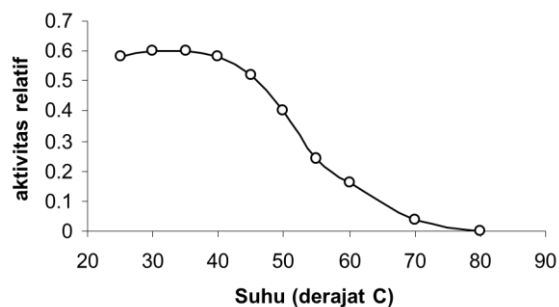


Gambar 4. Reaksi katalitik ALP [14]¹

Pengaruh enkapsulasi terhadap stabilitas enzim diamati dari pengaruh suhu reaksi (gambar 5) dan pH sistem (gambar 6).



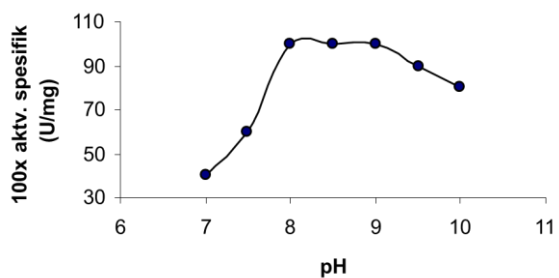
a.



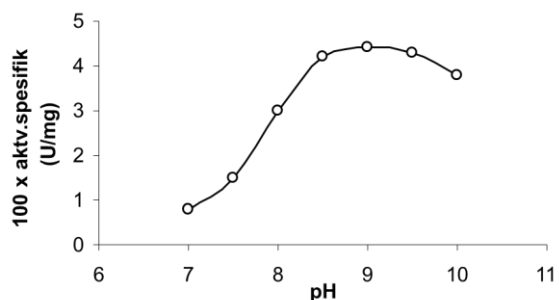
b.

Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Dari gambar 5 terlihat bahwa enkapsulasi menyebabkan pergeseran suhu optimum reaksi enzimatik maupun daya katalitikya.



a.

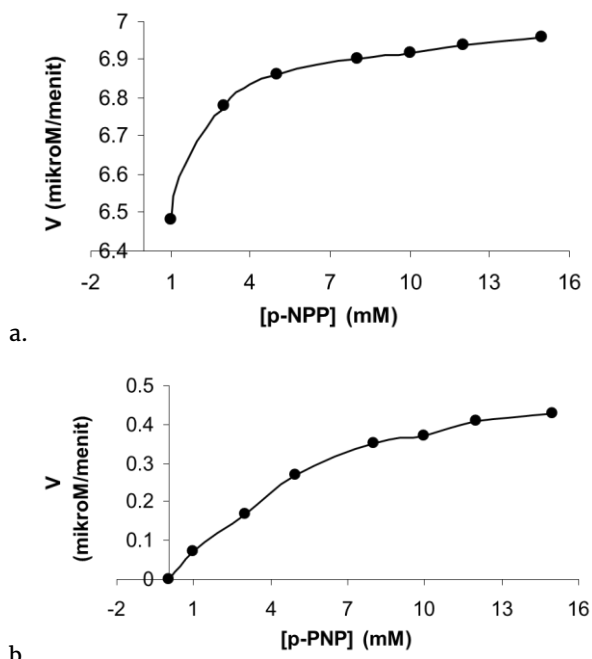


b.

Gambar 6. Pengaruh pH pada aktivitas enzim (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Pengaruh enkapsulasi terhadap range pH kerja enzim relative tidak berubah, sedangkan pH optimum sedikit bergeser ke arah yang lebih tinggi (dari 8 ke 9), seperti terlihat pada gambar 6. Dari hasil tersebut mengisyaratkan bahwa enzim terenkapsulasi dalam silika kemungkinan lebih stabil dibanding enzim bebas dalam larutan.

Sifat kinetik enzim ALP diamati melalui variasi konsentrasi substrat pNPP, sehingga diperoleh kurva Michaelis-Menten (gambar 7).



Gambar 7. Kurva Michaelis-Menten dalam larutan (a) ALP bebas (b) ALP terenkapsulasi dalam silika

Dari gambar 7 terlihat bahwa baik ALP bebas maupun terenkapsulasi dalam silika mengikuti kurva Michaelis-Menten, sehingga dengan mengubah kurva tersebut menjadi kurva linear Lineweaver-Burk, diperoleh parameter-parameter kinetika enzim seperti ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Parameter-parameter kinetika enzim ALP

No.	Enzim ALP	Km (mM)	Vmaks (μM/menit)	Aktv. spesifik U/mg enzim
1.	Bebas	0,08	7,077	1,041
2.	Terenkapsulasi	7,50	0,775	0,051

Dari tabel 2 terlihat bahwa enkapsulasi berhasil dilakukan, namun ALP mengalami penurunan aktivitas yang cukup drastic dan reaksi enzimatik juga berlangsung relative lebih lambat. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya hambatan dalam interaksi antara substrat dengan enzim. Hambatan tersebut kemungkinan disebabkan oleh matriks silika yang terbentuk dari silikat terlarut tidak cukup porous sehingga difusi substrat terhambat, atau terjadi interaksi antara permukaan silika dengan enzim sehingga mengubah konformasi gugus aktif enzim yang berakibat menurunkan aktivitasnya.

4. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Silikat terlarut yang dihasilkan dari ekstraksi abu sekam padi dapat digunakan sebagai matriks pada imobilisasi alkalin fosfatase melalui proses sol-gel, sedangkan pengaruh dari enkapsulasi tersebut adalah sebagai berikut:

Proses enkapsulasi ALP ke dalam silika dari abu sekam padi tidak merubah struktur silika, tetapi menambah gugus aktif dari silika gel yang dihasilkan.

Enkapsulasi ALP menurunkan aktivitas enzimatik ALP dari 1,041 U/mg enzim untuk enzim bebas dalam larutan menjadi 0,051 U/mg enzim untuk ALP terenkapsulasi, dan reaksi berlangsung lebih lambat (Vmaks 7,077 μM/menit turun menjadi 0,775 μM/menit).

Enkapsulasi ALP meningkatkan kestabilan enzim, sehingga range suhu kerja enzim dan pH kerja enzim bergeser lebih tinggi (suhu optimum meningkat dari 40°C menjadi 45°C, dan pH optimum meningkat dari 8,5 menjadi 9).

Saran

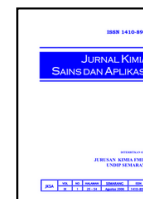
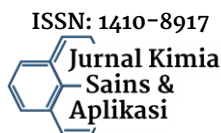
Untuk memperkecil penurunan aktivitas enzim sebagai akibat dari enkapsulasi perlu diupayakan untuk memodifikasi matriks dengan tujuan mengatasi hambatan difusi substrat.

Untuk pengembangan lebih lanjut ke arah biosensor perlu diuji pemakaian secara berulang (*recycle*).

5. Daftar Pustaka

- [1] Trevor Palmer, Understanding enzymes, 4 ed., Prentice Hall/Ellis Horwood, 1995.
- [2] F. Sharmin, S. Rakshit, H. Jayasuriya, Enzyme Immobilization on Glass surfaces for the development of Phosphate detection Biosensors, Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal, 9, (2007) 1-12
- [3] Rosaria Ciriminna, Mario Pagliaro, Recent Uses of Sol-Gel Doped Catalysts in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industry, Organic Process Research & Development, 10, 2, (2006) 320-326 <http://dx.doi.org/10.1021/op050211u>
- [4] Tuan Le, Selina Chan, Bassem Ebaïd, Monika Sommerhalter, Silica Sol-Gel Entrapment of the Enzyme Chloroperoxidase, Journal of Nanotechnology, 2015, (2015) 10 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/632076>
- [5] Sriyanti, Taslimah, Nuryono, Narsito, Sintesis Bahan Hibrida Amino-Silika dari Abu Sekam Padi Melalui Proses Sol-Gel, Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi, 8, 1, (2005) 1-10
- [6] U. Kalapathy, A. Proctor, J. Shultz, A simple method for production of pure silica from rice hull ash, Bioresource Technology, 73, 3, (2000) 257-262 [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00127-3)
- [7] U. Kalapathy, A. Proctor, J. Shultz, An improved method for production of silica from rice hull ash, Bioresource Technology, 85, 3, (2002) 285-289 [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00116-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00116-5)
- [8] C. Jeffrey Brinker, George W. Scherer, Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing, Academic Press, 1990.
- [9] Yen Wei, Jigeng Xu, Qiuwei Feng, Hua Dong, Muduo Lin, Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process, Materials Letters, 44, 1, (2000) 6-11 [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00287-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00287-6)

- [10] M. H. Ross, J. O. Ely, J. G. Archer, Alkaline phosphatase activity and pH optima, *Journal of Biological Chemistry*, 192, 2, (1951) 561-568
- [11] Nuryono, Kajian Perbandingan Silika termodifikasi gugus sulfonat and iminodiasetat pada pemisahan logam alkali tanah dengan kromatografi ion, in: *The First National Seminar of Ecotoxicology and Environmental Chemistry*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1998.
- [12] Ralph K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, Wiley, 1979.
- [13] Sriyanti, Taslimah, Nuryono, Narsito, Selektivitas Silika Gel Termodifikasi Gugus Tiol untuk Adsorpsi kadmium(II) dan Tembaga(II), *Seminar Nasional Hasil Penelitian MIPA 2004*, Semarang, (2004).
- [14] George N. Bowers, Robert B. McComb, Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum, *Clinical chemistry*, 21, 13, (1975) 1988-1995



Isolasi, Fabrikasi dan Penentuan Ukuran Nanopartikel Steroid (StrNPs) Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dengan Metoda *Dynamic Light Scattering*

Shelly Wiarsih^a, Dewi Kusriani^a, Pratama Jujur Wibawa^{a,*}

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: pratamajw@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: red ginger, <i>Alpinia purpurata</i>, steroids, steroid nanoparticles.</p>	<p>Research on steroid of red ginger (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) and the fabrication of steroid nanoparticles (StrNPs) has been done. The aim of this research is to isolate steroids from red ginger (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) tissue and then fabricate the isolated steroid to become StrNPs. The associated steroid was isolated as <i>n</i>-hexane fraction through the subsequently works such as maceration, extraction, and column chromatography. While the StrNPs were fabricated by colloidal method under ultrasonic agitation of 40 kHz, 2×50 watt for 10 minutes. The molecular structure of the isolated steroid was elucidated based on the molecular structure data base similarity index that generated by <i>gas chromatography-mass spectrometer</i> (GC-MS). The size of the fabricated StrNPs was determined by <i>dynamic light scattering</i> (DLS) method using particle size analyser (PSA) machine. The results show that the isolated steroid can be classified as progesterone group and the particle size of the fabricated StrNPs are about 95,0 ± 12,2 nm for the first group and 670,2 ± 141,1 nm for StrNPs of the second group.</p>
<p>Kata kunci: lengkuas merah, <i>Alpinia purpurata</i>, steroid, nanopartikel steroid.</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan penelitian mengenai steroid dari rimpang lengkuas merah (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) dan pabrikasi nanopartikelnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh isolat steroid dari rimpang lengkuas merah (<i>Alpinia purpurata</i> K. Schum) dan memperoleh nanopartikel steroid dari hasil isolasi. Senyawa steroid diisolasi dari fraksi <i>n</i>-heksana dengan maserasi, ekstraksi, dan kromatografi kolom. Nanopartikel steroid difabrikasi dengan ultrasonikasi (40 kHz, 2×50 watt for 10 menit). Struktur molekul steroid diidentifikasi dengan <i>gas chromatography-mass spectrometer</i> (GC-MS). Ukuran nanopartikel steroid dikarakterisasi dengan metoda <i>dynamic light scattering</i> (DLS) menggunakan alat <i>particle size analyzer</i> (PSA). Hasil menunjukkan bahwa isolat steroid mengandung senyawa golongan progesteron. Ukuran rata-rata nanopartikel steroid secara statistik adalah 95,0 ± 12,2 nm untuk nanopartikel steroid (StrNPs) kelompok I dan 670,2 ± 141,1 nm untuk StrNPs kelompok II.</p>

1. Pendahuluan

Rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) merupakan keluarga tanaman *Zingiberaceae* yang secara tradisional luas digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti sakit kepala, rematik, sakit

tenggorokan, dan penyakit ginjal [1, 2]. Selain itu, beberapa penelitian melaporkan bahwa rimpang lengkuas merah juga menunjukkan bioaktivitas sebagai antimikroba [3], antioksidan, antikanker [4] dan antibakteri terutama bakteri *Mycobacterium tuberculosis* penyebab penyakit tuberkulosis (TBC) [5]. Fenomena ini

menarik perhatian para peneliti untuk melakukan penelitian yang lebih mendalam untuk menemukan jenis senyawa kimia, terutama metabolit sekunder yang terdapat di dalam rimpang lengkuas merah. Salah satu penelitian ini melaporkan bahwa rimpang lengkuas merah diketahui mengandung steroid, flavonoid, alkaloid, fenol, tanin, karbohidrat, protein, glikosida, resin, tiol, saponin, dan gula pereduksi [6]. Namun demikian, penelitian-penelitian yang khusus dan fokus untuk mengeksplorasi steroid saja dalam lengkuas merah, dalam pengertian tidak hanya isolasi dan karakterisasi tetapi juga pembentukan nanopartikelnya, masih sangat sedikit yang melakukan. Hal ini ditunjukkan dengan publikasi tentang steroid rimpang lengkuas merah yang masih sangat sulit ditemukan, baik yang berupa jurnal, *proceeding* seminar, maupun buku.

Di pihak lain, penelitian-penelitian mengenai nanopartikel berkembang begitu pesat dan merambah keberbagai disiplin ilmu pengetahuan. Hal ini terkait dengan salah satu sifat unggul nanopartikel yang tidak dimiliki oleh jenis material yang lain, yaitu rasio luas permukaan terhadap volumenya yang jauh lebih besar dibanding material-material lain pada keadaan normalnya. Situasi ini mengakibatkan sifat-sifat nanopartikel menjadi lebih ditentukan oleh sifat-sifat permukaan dibanding oleh komposisinya. Sifat-sifat permukaan ini memainkan peran yang sangat penting bagi perjalanan suatu obat menuju reseptor atau massa target di dalam sel [7]. Permukaan yang luas akan meningkatkan gaya-gaya adhesi yang dapat mempercepat pelarutan dan mempermudah masuknya sebuah nanopartikel ke dalam membran sel disamping memberikan efek titik kuantum (*quantum dot effect*) yang baik [7, 8]. Fenomena ini dibuktikan oleh Basniwal *dkk.* [9] yang mencatat bahwa sifat antibakteri kurkumin terhadap *B. subtilis* meningkat sekitar 33% setelah dalam bentuk nanopartikelnya (KurNPs) [9]. Fakta ini menginspirasi untuk tidak saja mengisolasi dan mengkarakterisasi steroid lengkuas merah tetapi juga membuat nanopartikel steroid (StrNPs). Selanjutnya, paper ini melaporkan cara isolasi, karakterisasi dan cara membuat nanopartikel steroid (StrNPs) rimpang lengkuas merah.

2. Metode Penelitian

Bahan

Rimpang lengkuas merah lokal Semarang, Jawa Tengah, etanol 96% teknis, akuades, metanol teknis, *n*-heksana teknis, kloroform teknis, pereaksi Liebermann-Burchard, kloroform p.a., *n*-heksana p.a., etil asetat p.a., silika gel 60 G, plat KLT, plat KLT preparatif, aqua bides dan *virgin coconut oil* (VCO) komersial lokal. Bahan-bahan kimia ini diproduksi oleh Merck, Jerman dan digunakan sesuai aslinya tanpa perlakuan lebih lanjut.

Alat

Alat gelas standar penelitian, lampu UV 254 nm dan 365 nm, satu set alat maserasi dan *rotary evaporator* Buchii, neraca analitik, botol vial, kolom kromatografi, *chamber* KLT, *melting point*, pipa kapiler,

GCMS-QP2010S Shimadzu, KRISBOW *Ultrasonic Cleaner*, dan HORIBA *Scientific particle size analyzer*.

Persiapan Bahan dan Skrining Fitokimia

Sampel rimpang lengkuas merah sebanyak 20 kg dibersihkan dengan air, dikeringkan pada temperatur kamar, dan dihaluskan hingga menjadi serbuk. Setelah itu dilakukan skrining fitokimia yang meliputi uji steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan kuinon berdasarkan metoda yang dilaporkan oleh Subramanian [6].

Isolasi steroid dan elusidasi struktur

Serbuk lengkuas merah sebanyak 2 kg dimaserasi dengan etanol 96% selama 24 jam kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dilarutkan kedalam metanol dan difraksinasi menggunakan eluen *n*-heksana. Ekstrak ini kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental *n*-heksana. Terhadap ekstrak *n*-heksana ini dilakukan uji steroid. Sementara itu untuk mendapatkan steroid murni dilakukan kromatografi kolom gravitasi terhadap ekstrak kental *n*-heksana. Fraksi-fraksi yang didapatkan dari proses kromatografi ini kemudian dilakukan KLT dan fraksi dengan pola nada yang sama digabungkan menjadi satu fraksi. Fraksi yang mengandung steroid dipisahkan dengan KLT preparatif, nada yang terlihat dominan dikerok, dilarutkan dengan kloroform, dan diuapkan hingga diperoleh isolat steroid. Isolat steroid diuji kemurnian dengan KLT dua dimensi menggunakan berbagai eluen dan ditentukan titik lelehnya menggunakan *melting point tester*.

Selanjutnya elusidasi struktur steroid dilakukan menggunakan GCMS-QP2010S Shimadzu (kolom AGILENT HP 1MS, panjang 30 m, internal diameter 0,25 mm, gas pembawa helium). GC-MS dioperasikan pada kondisi temperatur injektor 310°C, tekanan 13,7 kPa, aliran total gas pembawa 12,9 mL/menit, temperatur kolom terprogram 200°C selama 5 menit kemudian dinaikkan temperaturnya dengan laju 5°C/menit hingga 300°C. Puncak-puncak kromatogram yang dihasilkan dengan intensitas puncak yang relatif tinggi dilakukan analisis fragmentasi massa dan fragmen-fragmen massa yang dihasilkan dengan kelimpahan lebih dari 25% diambil sebagai dasar penentuan struktur molekul steroid melalui pendekatan basis data indek kemiripan struktur (*molecular structure similarity index*) lebih dari 85%.

Fabrikasi dan karakterisasi nanopartikel steroid (StrNPs)

Fabrikasi StrNPs dapat dilakukan sebagai berikut, kristal isolat steroid sebanyak 10 mg dicampurkan kedalam 10 mL larutan aquabides/VCO perbandingan volum 9:1 kemudian diultrasonikasi menggunakan KRISBOW *Ultrasonic Cleaner* (frekwensi gelombang ultrasonik 40 kHz, daya 2×50 watt) selama 10 menit. Ukuran partikel StrNPs ditentukan berdasarkan metoda *dynamic light scattering* (DLS) menggunakan Horiba *Scientific particle size analyzer* buatan USA.

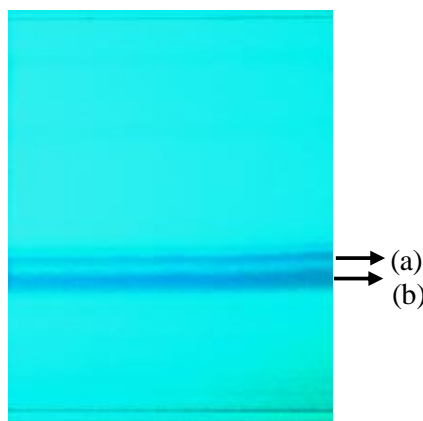
3. Hasil dan Pembahasan

Sekrining fitokimia dan isolasi steroid

Hasil sekrining fitokimia terhadap serbuk lengkuas merah memastikan bahwa beberapa jenis senyawa metabolit sekunder berikut ini positif terdapat didalam lengkuas merah, steroid/triterpenoid, saponin, flavonoid, alkaloid, tanin, dan kuinon. Selanjutnya hasil isolasi steroid dari sejumlah rimpang lengkuas merah tersebut di atas diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 78,98gram dengan rendemen sebesar 3,95 %. Setelah dilakukan proses fraksinasi terhadap ekstrak etanol ini dengan *n*-heksana dihasilkan ekstrak kental sebanyak 9,88 gram yang positif mengandung senyawa steroid.

Proses pemurnian steroid yang dilakukan dengan KLT memberikan hasil terbaik ketika menggunakan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) yang diterapkan pada kromatografi kolom gravitasi. Pemisahan ekstrak *n*-heksana menghasilkan 220 fraksi yang dikelompokkan ke dalam 8 fraksi besar (A, B, C, D, E, F, G, dan H). Fraksi besar E, F, G, dan H positif terhadap steroid dan digabungkan sebagai fraksi S. Selanjutnya fraksi S dipisahkan dengan KLT preparatif menggunakan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) Dari pemisahan ini dihasilkan tiga pita dominan, yaitu pita S₁ dengan R_f 0,42 (pada λ 365 nm), pita S₂ dengan R_f 0,50, dan S₃ dengan R_f 0,62 (pada λ 254 nm). Pita S₂ kemudian dipisahkan dengan eluen *n*-heksana/kloroform (3:7) dan dihasilkan pita S_{2a} dengan R_f 0,37 dan pita S_{2b} dengan R_f 0,42 pada λ 254 nm. Pita S_{2a} kemudian dipisahkan dengan eluen *n*-heksana/kloroform (4:6) kembali dan dihasilkan pita S_{2a1} dengan R_f 0,43 dan pita S_{2a2} dengan R_f 0,53 yang dapat dilihat pada gambar 1.

Proses KLT lebih lanjut yang meliputi KLT dua dimensi terhadap pita S_{2a1} ini menghasilkan noda tunggal, dan steroid yang diperoleh memiliki titik leleh sebesar 218–220°C.

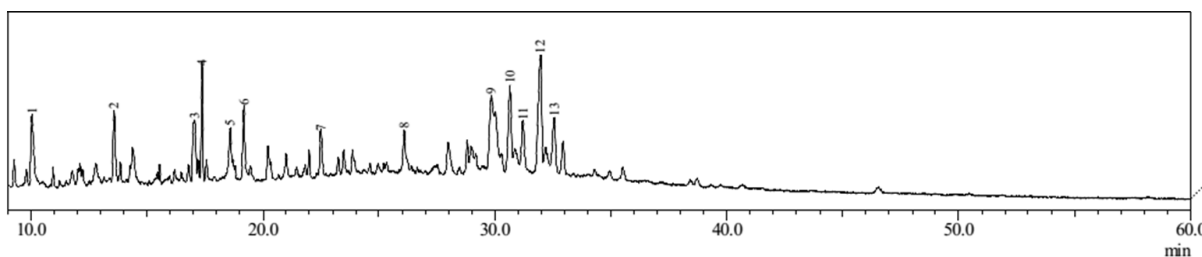


Gambar 1: Pita noda pemisahan steroid (a) fraksi S_{2a2}, (b) fraksi S_{2a1}

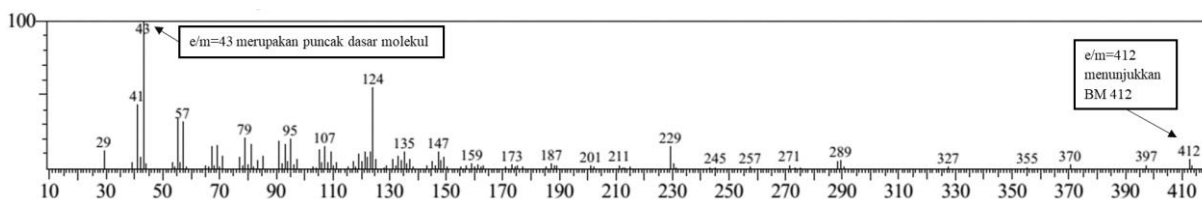
Elusidasi struktur steroid

Kromatogram hasil analisis isolat steroid pita S_{2a1} yang dilakukan dengan GC ditampilkan pada gambar 2. Gambar ini memperlihatkan 13 puncak yang merepresentasikan terdapat 13 jenis senyawa di dalam isolat S_{2a1}.

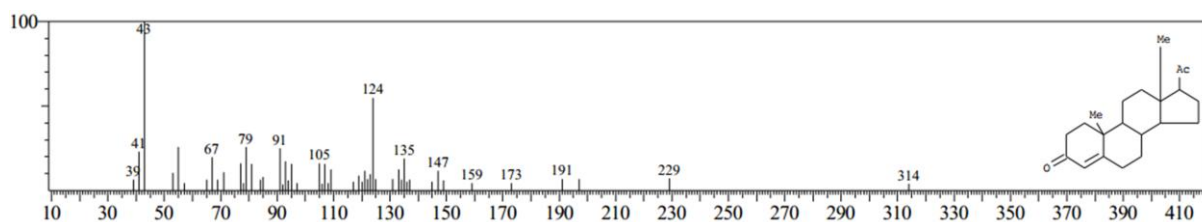
Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat steroid S_{2a1} sesungguhnya belum merupakan senyawa murni untuk tingkat kualitas analisis GC meskipun sudah merupakan senyawa tunggal untuk tingkat kualitas analisis KLT dua dimensi. Dari 13 senyawa ini selanjutnya dipilih satu senyawa yang memberikan intensitas puncak tertinggi, yaitu puncak ke-12 untuk difragmentasi lebih lanjut guna mengetahui struktur molekul senyawa yang memberikan puncak ke-12 ini. Hasil fragmentasi massa senyawa puncak ke-12 ini ditampilkan pada gambar 3.



Gambar 2: Kromatogram GC isolat steroid S_{2a1}



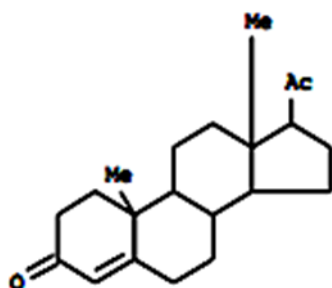
Gambar 3: Fragmentogram massa molekul puncak ke-12 kromatogram isolat S_{2a1}



Gambar 4: Spektogram pola fragmentasi massa senyawa/molekul basis data yang paling mendekati pola fragmentasi massa senyawa puncak ke-12 isolat S_{2a1} yang ditampilkan pada gambar 3 dengan indeks kemiripan 87%.

Terlihat pada gambar 3 bahwa senyawa/molekul yang memberikan puncak ke-12 itu memiliki berat molekul (BM) sekitar 412 gram/mol sebagaimana yang direpresentasikan oleh rasio massa/muatan (m/e) = 412. Disamping itu, molekul ini juga memberikan fragmen massa yang paling stabil yang merupakan puncak dasar (base peak) dengan m/e=43. Berdasarkan BM dan puncak dasar ini selanjutnya struktur molekul senyawa tersebut ditentukan melalui matching basis data indeks kemiripan molekul > 85%, yang hasilnya ditampilkan pada gambar 4.

Terlihat pada gambar 4 bahwa senyawa yang terdapat didalam isolate S_{2a1} dan memberikan puncak ke-12 pada analisis GC adalah mirip dengan senyawa pregn-4-ena-3,20-dion yang memiliki struktur molekul seperti yang terlihat pada gambar 4 itu (direproduksi kembali dan ditampilkan pada gambar 5), yang termasuk golongan steroid khususnya progesteron.

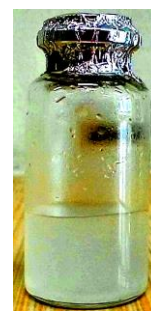


Gambar 5: Struktur molekul steroid yang paling mendekati steroid yang terdapat di dalam isolate S_{2a1} dan memberikan puncak ke-12 pada analisis GC

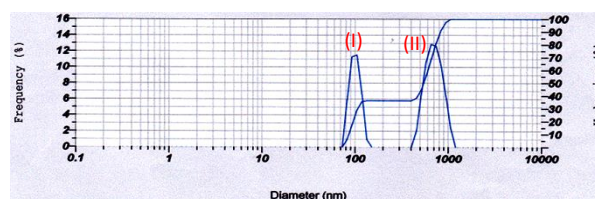
Fabrikasi dan karakterisasi nanopartikel steroid (StrNPs)

Hasil fabrikasi StrNPs adalah berupa koloid steroid di dalam media air/VCO berwarna putih susu seperti yang ditampilkan pada gambar 6a. Sedangkan grafik hasil penentuan ukuran partikel StrNPs menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA) ditampilkan pada gambar 6b dan analisis statistik ukuran rata-rata partikel ditampilkan pada tabel gambar 6c. Gambar 6b menunjukkan bahwa koloid StrNPs tersusun oleh dua kelompok partikel steroid yang berukuran diameter rata-rata kurang dari 100 nm dan satunya lagi kurang dari 1000 nm (1 μm). Perhitungan secara statistik menggunakan *Horiba scientific PSA software* menemukan bahwa ukuran diameter rata-rata kelompok partikel StrNPs yang pertama adalah 95,0 nm dengan standar deviasi (SD) sebesar 12,2 nm. Ini berarti ukuran partikel

StrNPs dalam kelompok I berkisar dari 82,8 nm hingga 107,2 nm (95,0 ± 12,2 nm) sebagaimana yang ditunjukkan pada tabel 1.



a.



(b)

Gambar 6: Hasil fabrikasi StrNPs (a) berupa koloid steroid di dalam media air/VCO yang berwarna putih susu, (b) grafik hasil penentuan ukuran StrNPs menggunakan PSA

Tabel 1. Tabel hasil perhitungan ukuran rata-rata statistik partikel StrNPs

Peak No.	S.P Area Ratio	Mean	S.D	Mode
1	0,36	95,0 nm	12,2 nm	96,5 nm
2	0,64	670,2 nm	141,1 nm	622,6 nm

Lebih lanjut kurva integrasi pada gambar 6b menunjukkan bahwa sekitar 40% dari jumlah partikel StrNPs yang terdapat pada kelompok I berukuran dibawah rata-rata (*mean*) keseluruhan partikel 95,0 nm. Sementara tabel gambar 6c (kolom *mode*) lebih lanjut menunjukkan bahwa partikel StrNPs yang berukuran 96,5 nm adalah partikel yang paling sering terdeteksi oleh detektor PSA. Hal yang sangat kontras diperlihatkan oleh partikel-partikel StrNPs yang bergabung kedalam kelompok II (lihat gambar 6b dan tabel gambar 6c) dimana rata-rata diameternya berukuran 670,2 nm dengan SD sebesar 141,1 nm. Ini sebuah ukuran yang cukup besar untuk skala nanopartikel. Kisaran ukuran partikel StrNPs dalam kelompok II ini adalah dari 529,1 nm hingga 811,3 nm (670,2 ± 141,1 nm). Kurva integrasi pada gambar 6b untuk partikel-partikel kelompok II menunjukkan bahwa sekitar 80 % jumlah partikel tersebut berukuran

lebih kecil dari 670,2 nm. Dapat pula ditambahkan bahwa partikel-partikel dalam kelompok II yang berukuran 622,6 nm merupakan partikel yang paling sering terdeteksi oleh detektor PSA (lihat tabel gambar 6c kolom *mode*).

Fakta-fakta ini menunjukkan bahwa nanopartikel steroid (StrNPs) terbukti dapat terbentuk melalui sistem dispersi koloidal menggunakan media air/VCO (rasio volum 9:1) dibawah pengaruh gelombang ultrasonik.

4. Kesimpulan

Berdasarkan uraian tersebut di atas, dapat disimpulkan bahwa steroid yang diisolasi dari rimpang lengkuas merah dapat dibuat menjadi nanopartikel steroid (StrNPs) berukuran $95,0 \pm 12,2$ nm untuk kelompok I dan $670,2 \pm 141,1$ nm untuk kelompok II. Lebih lanjut dapat disimpulkan bahwa tujuan penelitian ini secara keseluruhan berhasil dicapai dengan baik.

5. Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Bapak Hari, teknisi alat *particle size analyzer* (PSA) Laboratorium Fisika Farmasi Universitas Islam Indonesia (UII) Yogyakarta yang telah mengerjakan analisis sampel StrNPs.

6. Daftar Pustaka

- [1] Nurliani Bermawie, Susi Purwiyanti, Melati Melati, Nurlaila Wahyuni Meilawati, Karakter morfologi, hasil, dan mutu enam genotip lengkuas pada tiga agroekologi, Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, 23, 2, (2016) 125-135 <http://dx.doi.org/10.21082/bullitro.v23n2.2012.%25p>
- [2] Narayan Das Prajapati, S. S. Purohit, Arun K. Sharma, Tarun Kumar, A handbook of medicinal plants: A complete source book, Agrobios, India, 2003.
- [3] KP Kochuthressia, S John Britto, MO Jaseentha, L Joelri Michael Raj, SR Senthilkumar, Antimicrobial efficacy of extracts from *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. against human pathogenic bacteria and fungi, Agriculture and Biology Journal of North America, 1, 6, (2010) 1249-1252 <http://dx.doi.org/10.5251/abjna.2010.1.6.1249.1252>
- [4] Chinthamony Arul Raj, Paramasivam Ragavendran, Dominic Sophia, Muthaiyan Ahalliya Rathi, Velliur Kannappan Gopalakrishnan, Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer activity of *Alpinia purpurata*, Chinese Journal of Natural Medicines, 10, 4, (2012) 263-268 [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60053-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60053-3)
- [5] Oliver Villaflores, Allan Patrick Macabeo, Dietmar Gehle, Karsten Krohn, Scott Franzblau, Alicia Aguinaldo, Phytoconstituents from *Alpinia purpurata* and their in vitro inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*, Pharmacognosy Magazine, 6, 24, (2010) 339-344 <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.71785>
- [6] Vadivel Subramanian, Evaluation of antioxidant activity of *Alpinia purpurata* rhizome (Vieill),

International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 2, 4, (2016) 601-607

- [7] Rainer H. Müller, Sven Gohla, Cornelia M. Keck, State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 78, 1, (2011) 1-9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
- [8] Matthew N. Rhyner, Andrew M. Smith, Xiaohu Gao, Hui Mao, Lily Yang, Shuming Nie Nie, Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging, Nanomedicine, 1, 2, (2006) 209-217 <http://dx.doi.org/10.2217/17435889.1.2.209>
- [9] Rupesh Kumar Basniwal, Harpreet Singh Buttar, V. K. Jain, Nidhi Jain, Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 5, (2011) 2056-2061 <http://dx.doi.org/10.1021/jf104402t>