

**ISSN 1410-8917**  
**e-ISSN 2597-9914**

# **JURNAL KIMIA SAINS DAN APLIKASI**

**VOL. XX, No. 3, Oktober 2017**

**DITERBITKAN OLEH**

**DEPARTEMEN KIMIA FMIPA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

<b>JKSA</b>	<b>VOL</b>	<b>NO</b>	<b>HALAMAN</b>	<b>SEMARANG</b>	<b>ISSN</b>
	<b>XX</b>	<b>2</b>	<b>105 - 150</b>	<b>Oktober 2017</b>	<b>1410-8917 2597-9914</b>

**Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi**  
**Journal of Scientific and Applied Chemistry**  
**Editorial Team**

**Editor in Chief**

**Dr. Adi Darmawan**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Editorial Board**

**Dr. Nor Basid Adiwibawa Prasetya**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Dr. Yayuk Astuti**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Dr. Choiril Azmiyawati**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Dr. Mukhammad Asy'ari**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Didik Setiyo Widodo, M.Si**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

**Publisher**

Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

Jl. Prof. Soedharto, S.H., Tembalang, Semarang, 50275

Email : [jksa@live.undip.ac.id](mailto:jksa@live.undip.ac.id)

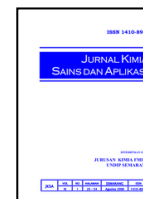
website : <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/ksa/>

Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi is indexed in



**Table of Contents**  
**Volume 20 Issue 3 Year 2017**  
**October 2017**

<a href="#">Efektivitas Fotodegradasi Amoksisilin yang Dikatalisis dengan TiO<sub>2</sub> dengan Keberadaan Ion Ag(I)</a>	105-109
Devina Ingrid Anggraini, I Pujilestari DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.105-109">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.105-109</a>	
<a href="#">Encapsulation of Alkaline Phosphatase in Mesoporous Methyl-Silica Hybrid by Sol-Gel Process</a>	110-113
Sriyanti Sriyanti DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.110-113">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.110-113</a>	
<a href="#">Perbandingan Pembacaan Absorbansi Menggunakan Spectronic 20 D+ dan Spectrophotometer UV-Vis T 60U Dalam Penentuan Kadar Protein dengan Larutan Standar BSA</a>	114-116
Sri Harjanto DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.114-116">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.114-116</a>	
<a href="#">Triterpenoid dan Nanopartikel Ekstrak n-Heksana dari Rimpang Lengkuas Merah (<i>Alpinia purpurata</i> (Vieill.) K. Schum) Serta Uji Sitotoksitas dengan BSLT</a>	117-122
Dian Nopitasari, Enny Fachriyah, Pratama Jujur Wibawa DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.117-122">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.117-122</a>	
<a href="#">Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (<i>Senna siamea</i> Lamk)</a>	123-129
Dita Widia Ningrum, Dewi Kusriani, Enny Fachriyah DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.123-129">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.123-129</a>	
<a href="#">Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (<i>Imperata cylindrica</i>) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram</a>	130-135
Moh. Mulyadi, Wuryanti Wuryanti, Purbowatiningrum Ria Sarjono DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.130-135">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.130-135</a>	
<a href="#">Sintesis Turunan Azomethin Sebagai Zat Aktif Inhibitor Korosi pada Logam Menggunakan Bahan Dasar Piperonal dan 2-Aminopiridin</a>	136-139
Intan Endah Rachmawati, Ngadiwiyana Ngadiwiyana, Ismiyanto Ismiyanto DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.136-139">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.136-139</a>	
<a href="#">Perbandingan Penentuan Kadar Aluminium dalam Antasida Menggunakan Metode Spektrometri Tampak dengan Spektrometri Serapan Atom</a>	140-141
Raharjo Raharjo DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.140-141">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.140-141</a>	
<a href="#">Pengaruh Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Spesifik Protease Ekstraseluler dan Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura</a>	142-145
Rahmad Budiharjo, Purbowatiningrum Ria Sarjono, Mukhammad Asy'ari DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.142-145">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.142-145</a>	
<a href="#">Sintesis Lempung Terpillar Polikation Aluminium Sebagai Adsorben Indigo Karmina</a>	146-150
Ari Kurniawan, Ahmad Suseno, Adi Darmawan DOI: <a href="https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.146-150">https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.146-150</a>	



## Efektivitas Fotodegradasi Amoksisilin yang Dikatalisis dengan TiO<sub>2</sub> dengan Keberadaan Ion Ag(I)

Devina Ingrid Angraini <sup>a\*</sup>, I. Pujilestari <sup>b</sup>

a Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Nasional Surakarta, Program Studi D3 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKES) Nasional Surakarta, Jl. Yos Sudarso No. 338 Dawung, Serengan, Surakarta

b Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi "Yayasan Pharmasi" Semarang

\* Corresponding author: [devina.ia@gmail.com](mailto:devina.ia@gmail.com)

Article Info	Abstract
<p>Keywords:            Amoxicillin, Ag(I) ions, electron, photodegradation, ·OH radical</p>	<p>An intensive use of medicines and their product provides not only benefits for human health but also carries side effect, such as an accumulation of waste. In the water environment, amoxicillin waste could mix with inorganic waste, such as Ag(I) ion. In this research, the study on amoxicillin photodegradation was conducted by combining UV-irradiation, semiconductor particles as the photocatalyst, and the presence of Ag(I) ions. This research aimed to determine the influence of UV-irradiation time, initial Ag(I) concentration, and the optimum conditions of amoxicillin photodegradation catalyzed by TiO<sub>2</sub> in the presence of Ag(I) ions. Amoxicillin photodegradation process was conducted in a closed reactor equipped with a magnetic stirrer and UV light. The results are then analyzed by UV spectrophotometer to determine the remaining amoxicillin concentration and atomic absorption spectrophotometer (AAS) to evaluate the concentration of the unreduced Ag(I) ions. The results showed that the degraded amoxicillin increased with increasing duration of irradiation due to the long contact between the TiO<sub>2</sub> photocatalyst and the UV light, and the contact between amoxicillin and the radical ·OH. The presence of Ag(I) ions might increase the effectiveness of amoxicillin photodegradation due to the prevention of the recombination between radical ·OH from hole species and the excited electron. The optimum condition of amoxicillin photodegradation is reached 32.40 % when 25 mL amoxicillin 200 mg/L and 25 mL of Ag(I) solution 40 mg/L, were added by 20 mg of TiO<sub>2</sub> and irradiated by UV light for 90 minutes. Under the same condition, Ag(I) ion was reduced up to 70.40 %.</p>
<p>Kata kunci:            amoksisilinelektron, radikal ·OH, fotodegradasi, ion Ag(I).</p>	<p><b>Abstrak</b></p> <p>Pemakaian obat dan sediaananya secara intensif, selain memberikan keuntungan dalam pelayanan kesehatan juga memiliki efek sekunder yaitu akumulasi limbah yang tidak diinginkan. Akumulasi zat antibiotik seperti amoksisilin di perairan dapat menyebabkan resistensi. Di lingkungan, limbah amoksisilin dapat bersama-sama dengan limbah anorganik seperti ion Ag(I). Kajian tentang fotodegradasi dilakukan dengan menggabungkan cahaya ultraviolet dan partikel semikonduktor sebagai fotokatalis. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruh penyinaran, keberadaan ion Ag(I), dan kondisi optimum terhadap efektivitas fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis TiO<sub>2</sub> dengan kehadiran ion Ag(I). Proses fotodegradasi amoksisilin dilakukan dalam suatu reaktor tertutup dilengkapi dengan satu set alat pengaduk magnetik dan lampu UV. Hasil kemudian dianalisis dengan Spektrofotometer UV untuk mengetahui konsentrasi amoksisilin sisa dan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) untuk mengetahui konsentrasi ion Ag(I) sisa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa amoksisilin yang terdegradasi meningkat dengan semakin lamanya waktu penyinaran karena lamanya</p>

kontak antara fotokatalis  $\text{TiO}_2$  dengan cahaya dan kontak antara amoksisilin dengan radikal  $\cdot\text{OH}$ . Keberadaan ion  $\text{Ag(I)}$  meningkatkan hasil fotodegradasi amoksisilin karena rekombinasi radikal  $\cdot\text{OH}$  yang berasal dari *spesies hole* dengan elektron tereksitasi dapat dicegah. Efektivitas fotodegradasi amoksisilin terjadi pada waktu penyinaran 90 menit, larutan amoksisilin 200 mg/L sebanyak 25 mL dengan penambahan ion  $\text{Ag(I)}$  40 mg/L sebanyak 25 mL, dan  $\text{TiO}_2$  sebagai katalis sebanyak 20 mg. Pada kondisi tersebut fotodegradasi amoksisilin sebesar 32,40 % dan persen ion  $\text{Ag(I)}$  yang tereduksi sebesar 70,40 %.

## 1. Pendahuluan

Limbah industri farmasi berkaitan erat dengan masalah pencemaran lingkungan khususnya pencemaran air [1]. Beberapa jenis obat, seperti antibiotik, hormon, pengawet, dan anestesi, telah teridentifikasi pada air tanah, air limbah, dan air minum [2]. Antibiotik banyak digunakan untuk pengobatan bagi manusia dan hewan sebagai obat antibakteri dan perangsang pertumbuhan [3]. Sumber utama dari antibiotik dan obat-obat lain dapat mencemari lingkungan berasal dari industri farmasi, pertanian intensif, dan residu ekskresi manusia [4].

Adanya antibiotik seperti amoksisilin di air limbah dapat mengganggu keseimbangan ekosistem dan residunya dapat memodifikasi informasi genetik bakteri alami sehingga terjadi resistensi [5], selain antibiotik terdapat senyawa lain yaitu logam berat, seperti ion  $\text{Ag(I)}$  yang memiliki efek toksik apabila terakumulasi dalam tubuh yang menyebabkan pelunturan warna kulit permanen pada manusia. Sehingga diperlukan penelitian untuk mengetahui metode penghilangan amoksisilin dan ion  $\text{Ag(I)}$  yang paling efektif.

Beberapa alternatif telah dilakukan untuk menghilangkan senyawa ini termasuk *reverse osmosis*, adsorpsi pada karbon aktif atau teknologi oksidasi lanjutan seperti reaksi fenton dan ozonisasi, namun cara ini mempunyai kelemahan pada penggunaannya karena harga yang mahal [6-8]. Dalam beberapa tahun terakhir, proses fotokatalisis untuk degradasi amoksisilin menggunakan  $\text{TiO}_2$  telah berpotensi untuk mengatasi pencemaran limbah dengan cara yang ramah lingkungan serta hemat biaya [9-11]. Sejauh ini,  $\text{TiO}_2$  sering digunakan sebagai fotokatalis pada reaksi degradasi polutan organik, seperti zat warna, pestisida, dan senyawa fenolik. Fotodegradasi senyawa organik dapat terjadi karena penyerangan oleh radikal  $\cdot\text{OH}$  yang dihasilkan oleh  $\text{TiO}_2$  dalam sistem reaksi. Penggunaan  $\text{TiO}_2$  untuk meningkatkan reaksi fotodegradasi zat warna telah dilaporkan [12, 13].  $\text{TiO}_2$  juga telah dibuktikan dapat mempercepat reaksi fotodegradasi fenol [14, 15], p-klorofenol [16, 17], pestisida [18], asam-asam karboksilat seperti asam oksalat dan asam malonat [19]. Secara umum hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode ini sangat efektif untuk mengoksidasi dan mendetoksi polutan-polutan organik tersebut. Selain itu, fotokatalis  $\text{TiO}_2$  dapat mereduksi ion  $\text{Ag(I)}$ , karena  $\text{TiO}_2$  mempunyai struktur semikonduktor yang dapat menyediakan elektron sehingga dapat merubah ion  $\text{Ag(I)}$  menjadi  $\text{Ag(0)}$  yang tidak toksik di lingkungan, dan *hole* yang ditinggalkan elektron akan bereaksi

dengan air sehingga dapat mendegradasi amoksisilin menjadi air dan  $\text{CO}_2$  [20]. Mengingat fotodegradasi merupakan pasangan fotoreduksi maka penelitian ini mempelajari fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis  $\text{TiO}_2$  dengan adanya ion  $\text{Ag(I)}$ .

## 2. Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $\text{TiO}_2$  (Merck), amoksisilin buatan Brataco Chemica,  $\text{AgNO}_3$  p.a. buatan Merck, dan kertas saring Whatman 42. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi reaktor yang dilengkapi dengan satu set alat pengaduk magnetik merk Spinbar ukuran 2 cm dan lampu UV 20 watt tipe *black light blue* (BLB) merk Philips. Alat gelas laboratorium dan instrumen yang digunakan meliputi erlenmeyer, pipet volume, corong gelas, labu ukur, gelas beker, neraca analitik, spektrofotometer serapan atom merk Perkin Elmer no seri 3110, dan spektrofotometer UV spectronic 20D+.

### Pembuatan Larutan Induk

Pada penelitian ini diperlukan larutan induk amoksisilin 200 mg/L dibuat dengan cara melarutkan 100,0 mg amoksisilin dalam akuades dan diencerkan dalam labu ukur 500 mL sampai tanda batas. Larutan induk ion  $\text{Ag(I)}$  1000 mg/L dibuat dengan cara melarutkan 1,5728 g  $\text{AgNO}_3$  dalam akuades dan diencerkan dalam labu ukur 1 L sampai tanda batas.

### Proses Fotodegradasi Amoksisilin yang Dikatalisis $\text{TiO}_2$

Proses fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis  $\text{TiO}_2$  dilakukan menggunakan sistem *batch* dalam reaktor tertutup yang dilengkapi dengan lampu UV dan *plate* pengaduk magnetik pada jarak  $\pm 20$  cm dari lampu UV. Proses tersebut dilakukan dengan cara menyinari campuran yang terdiri dari amoksisilin 200 mg/L sebanyak 25 mL, larutan ion  $\text{Ag(I)}$  40 mg/L sebanyak 25 mL, dan 20 mg serbuk  $\text{TiO}_2$  sehingga diperoleh suspensi. Erlenmeyer ditutup dengan plastik transparan kemudian disinari dengan lampu UV disertai pengadukan selama waktu bervariasi yaitu 30, 60, 90, 120, dan 150 menit. Untuk memperoleh filtrat dari suspensi tersebut dilakukan penyaringan dengan kertas saring whatman. Selanjutnya filtrat dianalisis dengan alat spektrofotometer UV untuk menentukan konsentrasi amoksisilin yang tidak terdegradasi dan alat spektrofotometer serapan atom (SSA) guna menentukan konsentrasi ion  $\text{Ag(I)}$  yang tidak tereduksi. Cara yang sama dilakukan untuk mempelajari pengaruh perbedaan konsentrasi ion  $\text{Ag(I)}$  terhadap fotodegradasi



amoksisilin yang dikatalisis TiO<sub>2</sub>. Proses dilakukan terhadap sistem yang terdiri dari amoksisilin 200 mg/L sebanyak 25 mL, larutan ion Ag(I) dengan konsentrasi yang bervariasi yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/L sebanyak 25 mL, dan 20 mg serbuk TiO<sub>2</sub>.

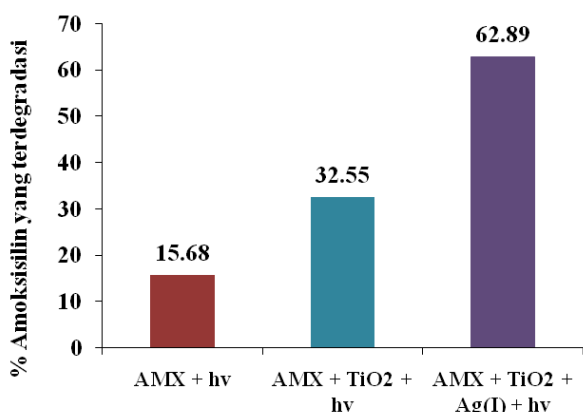
**Analisis Data**

Persentase amoksisilin (AMX) terdegradasi dapat diketahui dengan menghitung selisih antara konsentrasi amoksisilin awal dan konsentrasi amoksisilin sisa dengan menggunakan persamaan (1) :

$$\% \text{ AMX terdegradasi} = \frac{\text{konsentrasi AMX awal} - \text{konsentrasi AMX sisa}}{\text{konsentrasi AMX awal}} \times 100\% \tag{1}$$

**3. Pembahasan**

Proses fotodegradasi amoksisilin dengan adanya ion Ag(I) dilakukan dengan cara menyinari campuran dengan lampu UV dalam suatu reaktor tertutup. Campuran terdiri dari larutan amoksisilin, serbuk fotokatalis TiO<sub>2</sub>, dan larutan ion Ag(I). Agar reaksi fotodegradasi dan proses fotokatalitik dapat berlangsung efektif, maka lampu UV digunakan sebagai sumber energi foton dan dilakukan pengadukan menggunakan pengaduk magnet agar semua reaktan bercampur rata.



**Gambar 1.** Pengaruh cahaya, fotokatalis TiO<sub>2</sub>, dan keberadaan ion Ag(I) terhadap hasil fotodegradasi amoksisilin.

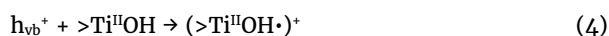
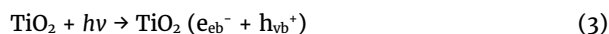
Untuk mengetahui pengaruh cahaya, fotokatalis, dan keberadaan ion Ag(I) terhadap fotodegradasi amoksisilin, telah dilakukan proses fotodegradasi amoksisilin tanpa maupun dengan fotokatalis serta tidak maupun dengan adanya ion Ag(I). Proses degradasi dilakukan dengan adanya pengadukan dan dengan penyinaran UV. Jumlah amoksisilin yang terdegradasi dapat dihitung dengan cara selisih konsentrasi amoksisilin awal dengan konsentrasi amoksisilin yang tidak terdegradasi. Hasil disajikan pada Gambar 1.

Proses penyinaran terhadap amoksisilin tanpa maupun dengan katalis TiO<sub>2</sub> menunjukkan penurunan konsentrasi amoksisilin ditunjukkan pada Gambar 1. Terjadinya penurunan konsentrasi tersebut disebabkan amoksisilin terdegradasi menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Hal ini

terjadi oleh adanya reaksi degradasi antara amoksisilin dengan radikal ·OH yang dihasilkan akibat peruraian molekul H<sub>2</sub>O setelah menyerap foton (hv) dalam reaksi fotolisis air. Reaksi fotolisis dituliskan sebagai berikut :



Tetapi dalam reaksi fotolisis air, pembentukan radikal ·OH relatif sulit, sehingga radikal ·OH yang terbentuk sedikit. Hal ini menyebabkan proses degradasi amoksisilin berjalan lambat dan persen degradasi amoksisilin menjadi rendah. Proses pembentukan elektron dan radikal ·OH pada permukaan fotokatalis ditunjukkan oleh reaksi:

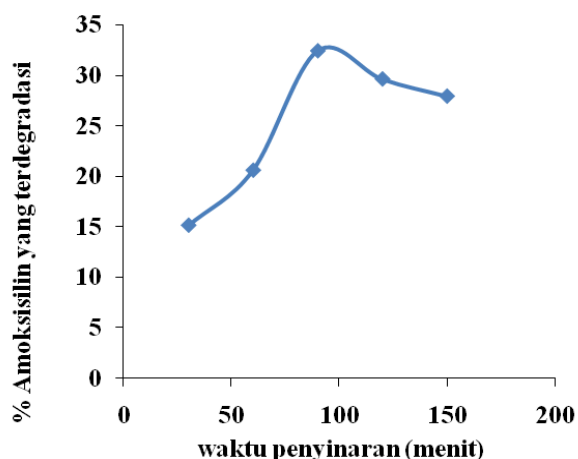


Proses adsorpsi mengindikasikan bahwa reaksi fotodegradasi yang dikatalisis TiO<sub>2</sub> diawali dengan adsorpsi amoksisilin pada permukaan fotokatalis yang selanjutnya amoksisilin yang terserap mengalami kontak dengan radikal ·OH pada permukaan TiO<sub>2</sub> sehingga berlangsung reaksi degradasi.

Pada saat TiO<sub>2</sub> dikenai sinar UV, maka terjadi eksitasi elektron dari pita valensi ke pita konduksi meninggalkan lubang positif (h<sub>vb</sub><sup>+</sup>) pada pita valensi. Spesies h<sub>vb</sub><sup>+</sup> akan terikat pada permukaan TiO<sub>2</sub> kemudian membetuk radikal ·OH dengan air. Reaksi pembentukan radikal ·OH dan pelepasan elektron ini berjalan relatif cepat dibandingkan reaksi fotolisis molekul air sehingga jumlah radikal ·OH dan elektron yang dihasilkan relatif lebih banyak [20, 21]. Dengan demikian radikal ·OH dan elektron tersedia dalam jumlah yang relatif lebih besar, dihasilkan dari reaksi fotolisis air serta dihasilkan oleh katalis TiO<sub>2</sub>. Hal tersebut menjelaskan peningkatan fotodegradasi amoksisilin dengan adanya fotokatalis TiO<sub>2</sub> lebih besar daripada tanpa fotokatalis.

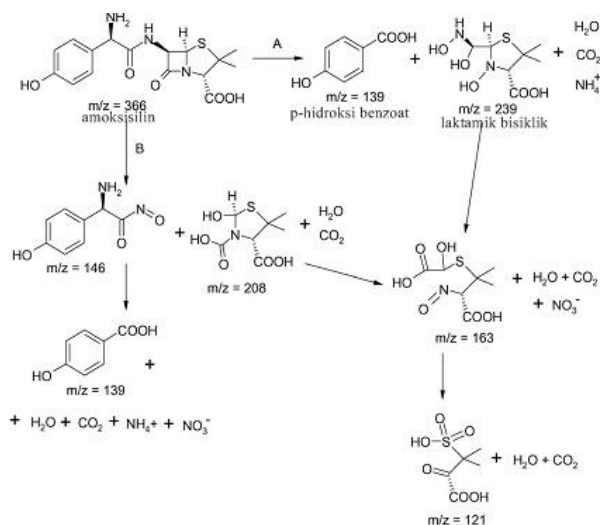
Adanya elektron yang dihasilkan dapat digunakan untuk mereduksi ion Ag(I). Ion Ag(I) selain dapat direduksi oleh elektron yang dihasilkan oleh TiO<sub>2</sub>, juga dapat berfungsi untuk mencegah penggabungan kembali antara radikal ·OH dan elektron, sehingga radikal ·OH yang dihasilkan oleh TiO<sub>2</sub> menjadi lebih banyak. Hal ini dapat mempengaruhi proses degradasi amoksisilin. Penurunan konsentrasi amoksisilin paling baik adalah dengan adanya penyinaran, katalis TiO<sub>2</sub>, dan ion Ag(I).

Pengaruh waktu penyinaran terhadap fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis TiO<sub>2</sub> dengan adanya ion Ag(I) dipelajari dengan melakukan reaksi pada waktu penyinaran yang bervariasi kondisi yang dilakukan pada kajian waktu penyinaran adalah 25 mL larutan amoksisilin 200 mg/L, serbuk TiO<sub>2</sub> 20 mg, dan 25 mL larutan ion Ag(I) 40 mg/L. Hasil disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh waktu penyinaran terhadap fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis TiO<sub>2</sub> dengan adanya ion Ag(I).

Lamanya waktu penyinaran dengan lampu UV dalam proses fotodegradasi amoksisilin menggambarkan lamanya interaksi atau kontak antara fotokatalis dengan cahaya (*hν*) dan kontak antara amoksisilin dengan radikal ·OH. Semakin lama waktu penyinaran maka kontak antara fotokatalis TiO<sub>2</sub> dengan cahaya (*hν*) juga semakin efektif, sehingga radikal ·OH yang dihasilkan di permukaan TiO<sub>2</sub> akan semakin banyak dan juga memungkinkan terjadinya kontak antara amoksisilin dengan radikal ·OH yang makin efektif. Namun pada waktu penyinaran 90 sampai 150 menit, amoksisilin yang terdegradasi mengalami penurunan, karena semakin banyaknya amoksisilin yang menempel pada permukaan TiO<sub>2</sub> [22]. Hal ini menyebabkan TiO<sub>2</sub> tidak dapat berinteraksi dengan sinar UV, sehingga jumlah radikal ·OH yang dihasilkan berkurang dan reaksi fotodegradasi pun berjalan lebih lambat. Pada Gambar 3 dapat dilihat urutan proses degradasi amoksisilin.

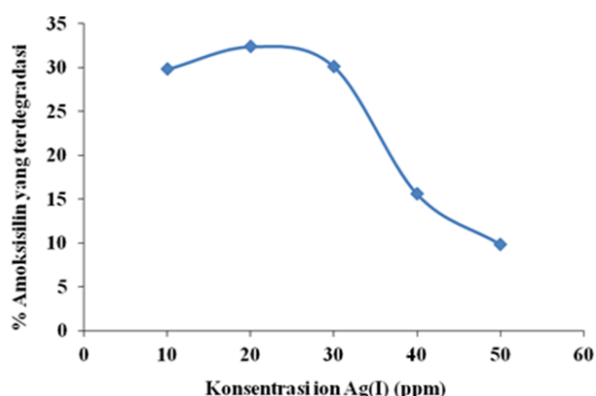


Gambar 3. Proses degradasi amoksisilin [11].

Proses fotodegradasi amoksisilin dapat dilakukan juga dengan berbagai metode, seperti yang dilakukan oleh Homem *dkk.* [7] melaporkan bahwa amoksisilin dapat didegradasi menggunakan proses fotofenton

dengan waktu penyinaran efektif pada 45 menit. Elmolla dan Chaudhuri [9] menyatakan bahwa fotokatalis ZnO dapat digunakan untuk mendegradasi amoxicillin dengan waktu penyinaran efektif pada 180 menit. Hal tersebut dapat digunakan untuk membandingkan bahwa proses fotodegradasi amoksisilin dengan fotokatalis TiO<sub>2</sub> lebih efektif dibandingkan proses fotofenton karena biaya yang dikeluarkan lebih murah dan jika dibandingkan dengan fotokatalis ZnO maka lama penyinarannya lebih singkat.

Kenaikan amoksisilin yang terdegradasi terjadi pada konsentrasi awal ion Ag(I) 10 mg/L sampai 20 mg/L, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4. Adanya kenaikan konsentrasi awal ion Ag(I) dalam campuran menunjukkan semakin banyaknya ion Ag(I) yang bereaksi dengan elektron, sehingga penggabungan antara radikal ·OH dan elektron tidak terjadi. Akan tetapi pada peningkatan konsentrasi awal larutan ion Ag(I) 20 mg/L sampai 50 mg/L fotodegradasi amoksisilin mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh jumlah elektron yang tetap tetapi jumlah ion Ag(I) terus bertambah, sehingga hampir semua elektron telah bereaksi dengan ion Ag(I). Berdasarkan data di atas dapat diketahui konsentrasi awal larutan ion Ag(I) yang memberikan fotodegradasi yang paling besar adalah pada konsentrasi 20 mg/L.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi ion Ag(I) terhadap fotodegradasi amoksisilin yang dikatalisis TiO<sub>2</sub>.

#### 4. Kesimpulan

Waktu penyinaran yang semakin lama meningkatkan kontak antara amoksisilin dengan radikal ·OH juga makin efektif, sehingga efektivitas fotodegradasi amoksisilin meningkat. Keberadaan ion Ag(I) dalam larutan dapat mencegah rekombinasi antara radikal ·OH yang berasal dari *spesies hole* dan terikat di permukaan fotokatalis dengan elektron yang tereksitasi sehingga efektivitas fotodegradasi meningkat.

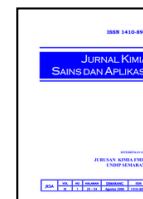
#### 5. Daftar Pustaka

[1] Daniele Maia Bila, Márcia Dezotti, *Pharmaceutical drugs in the environment, Química Nova*, 26, 4, (2003) 523–530 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>

[2] C. Reyes, J. Fernández, J. Freer, M. A. Mondaca, C. Zaror, S. Malato, H. D. Mansilla, *Degradation and inactivation of tetracycline by TiO<sub>2</sub> photocatalysis*,

- Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184, 1, (2006) 141-146  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.04.007>
- [3] Klaus Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, *Chemosphere*, 75, 4, (2009) 417-434  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- [4] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten Lützhøft, S. E. Jørgensen, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere*, 36, 2, (1998) 357-393  
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8)
- [5] Céline Tixier, Heinz P. Singer, Sjeff Oellers, Stephan R. Müller, Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters, *Environmental Science & Technology*, 37, 6, (2003) 1061-1068  
<http://dx.doi.org/10.1021/es025834r>
- [6] J. Fernández, J. Kiwi, C. Lizama, J. Freer, J. Baeza, H. D. Mansilla, Factorial experimental design of Orange II photocatalytic discoloration, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 151, 1, (2002) 213-219  
[https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00153-3)
- [7] Vera Homem, Arminda Alves, Lúcia Santos, Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments, *Science of The Total Environment*, 408, 24, (2010) 6272-6280  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.058>
- [8] F. Javier Benitez, Juan Luis Acero, Francisco J. Real, Gloria Roldan, Francisco Casas, A Comparison Study of the Removal of Selected Pharmaceuticals in Waters by Chemical Oxidation Treatments, *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 5, 6, (2011) 456-459
- [9] Emad S Elmolla, Malay Chaudhuri, Photocatalytic Degradation of Some Antibiotics in Aqueous Solution, Water Malaysia, Kuala Lumpur, (2009).
- [10] L. Rizzo, S. Meric, M. Guida, D. Kassinos, V. Belgiorno, Heterogenous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals, *Water Research*, 43, 16, (2009) 4070-4078  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.046>
- [11] D. Klauson, J. Babkina, K. Stepanova, M. Krichevskaya, S. Preis, Aqueous photocatalytic oxidation of amoxicillin, *Catalysis Today*, 151, 1, (2010) 39-45  
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2010.01.015>
- [12] L. Lucarelli, V. Nadtochenko, J. Kiwi, Environmental Photochemistry: Quantitative Adsorption and FTIR Studies during the TiO<sub>2</sub>-Photocatalyzed Degradation of Orange II, *Langmuir*, 16, 3, (2000) 1102-1108  
<http://dx.doi.org/10.1021/la990272j>
- [13] R. Ramli, Kajian Fotodegradasi Zat Warna Orange II yang Terkatalisis Oleh TiO<sub>2</sub>, Jurusan Kimia, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- [14] J. Matos, J. Laine, J. M. Herrmann, Effect of the Type of Activated Carbons on the Photocatalytic Degradation of Aqueous Organic Pollutants by UV-Irradiated Titania, *Journal of Catalysis*, 200, 1, (2001) 10-20  
<https://doi.org/10.1006/jcat.2001.3191>
- [15] Ana M. Peiró, José Antonio Ayllón, José Peral, Xavier Doménech, TiO<sub>2</sub>-photocatalyzed degradation of phenol and ortho-substituted phenolic compounds, *Applied Catalysis B: Environmental*, 30, 3, (2001) 359-373  
[https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00248-4)
- [16] Luis J. Alemany, Miguel A. Banares, Encarnación Pardo, Francisco Martin, Mercedes Galán-Fereres, JoséM Blasco, Photodegradation of phenol in water using silica-supported titania catalysts, *Applied Catalysis B: Environmental*, 13, 3, (1997) 289-297  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0926-3373\(97\)00006-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0926-3373(97)00006-4)
- [17] Wastini, Kajian Pengaruh Ion Cr (VI) Terhadap Efektivitas Fotodegradasi p-klorofenol Terkatalisis TiO<sub>2</sub>, Jurusan Kimia, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- [18] Ioannis K. Konstantinou, Theophanis M. Sakellarides, Vasilis A. Sakkas, Triantafyllos A. Albanis, Photocatalytic Degradation of Selected s-Triazine Herbicides and Organophosphorus Insecticides over Aqueous TiO<sub>2</sub> Suspensions, *Environmental Science & Technology*, 35, 2, (2001) 398-405  
<http://dx.doi.org/10.1021/es001271c>
- [19] S. Ruhayatun, Pengaruh Asam Oksalat dan Asam Malonat Terhadap Efektivitas Fotoreduksi Ion Cr(VI) Terkatalisis TiO<sub>2</sub>, Jurusan Kimia, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- [20] Michael R. Hoffmann, Scot T. Martin, Wonyong Choi, Detlef W. Bahnemann, Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis, *Chemical Reviews*, 95, 1, (1995) 69-96  
[10.1021/cr00033a004](https://doi.org/10.1021/cr00033a004)
- [21] Amy L. Linsebigler, Guangquan Lu, John T. Yates, Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results, *Chemical Reviews*, 95, 3, (1995) 735-758  
<http://dx.doi.org/10.1021/cr00035a013>
- [22] Richard I. Masel, Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces, Wiley, 1996.





## Encapsulation of Alkaline Phosphatase in Mesoporous Methyl-Silica Hybrid by Sol-Gel Process

Sriyanti <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> 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](mailto:sriyanti@live.undip.ac.id)

### Article Info

Keywords:  
encapsulation,  
alkaline  
phosphatase,  
methyl-silica  
hybrid, sol-gel

### Abstract

In recent years, the sol-gel technique has attracted increasing interest as a unique approach to immobilize biomolecules for bioanalytical applications as well as biochemical and biophysical studies. In this research, encapsulation of Alkaline Phosphatase (ALP) enzyme in mesoporous methyl-silica hybrid by sol-gel process has been carried out. Mesoporous methyl-silica hybrid has been synthesis by using tetraethylorthosilicate (TEOS) and methyltriethoxysilane (MTES) as precursor and poly(ethylene) glycol (PEG) as a polymer dopant. The preparation of methyl-silica hybrid was carried out at various mol ratios of precursors and PEG concentration. Encapsulation was emphasized by mixing sol solution and tris-HCl buffer containing ALP. The Surface Area Analyzer analysis data showed that the pore diameter and surface area of methyl-silica hybrid tended to increase as the PEG dopant concentration increases. Result showed that ALP encapsulated in the methyl-silica hybrids with PEG dopant gave enzymatic activity as 0.112 U/mg enzyme, higher than ALP encapsulated in copolymerization of TEOS with MTES or in silica from TEOS precursor only (0.098 U/mg enzyme and 0.069 U/mg enzyme, respectively). It was shown that copolymerization of TEOS with organosilane precursor and the entrapment of polymer additives into sol-gel processed materials are useful methods for modifying the internal environment and hence the activity of biomolecules entrapped in sol-gel derived biomaterials.

### 1. Introduction

Encapsulation of biomolecules such as enzymes, proteins, cells and microorganisms in porous metal oxides by physical entrapment via sol-gel process has drawn great interest in recent years. The encapsulation of enzymes by sol-gel methods is commonly carried out through four stages, namely acid catalyzed hydrolysis of alkoxysilane precursors, addition of aqueous buffer solution containing enzyme, aging and drying to produce optically transparent glass materials with the enzyme entrapped [1-3].

The entrapment of protein into a silica matrix can result in a range of possible environments for the entrapped protein. Some of the proteins are entrapped in pores which are completely accessible to the analyte, some in the pores that are partially accessible, while the remainder of the protein may be sequestered into pores which are completely inaccessible. Pore sizes of the

silica matrices and analyte-matrix interactions such as electrostatic, hydrogen bonding and hydrophobic interactions play an important role in determining the accessibility of an analyte to entrapped proteins [4, 5]. Therefore, in order to maximize the accessibility, some modifications should be employed including manipulation of sol-gel synthesis conditions, incorporation of polymer or other additives, manipulation of aging conditions to minimize silanol content, manipulation of pH conditions or use of templating agents to promote larger pores (mesopores) [6].

In this research, encapsulation of Alkaline Phosphatase (ALP) enzyme in mesoporous methyl-silica hybrid by sol-gel process has been carried out. Mesoporous methyl-silica hybrid has been synthesis by using tetraethylorthosilicate (TEOS) and methyltriethoxysilane (MTES) as precursor and poly(ethylene) glycol (PEG) as a polymer dopant.

## 2. Experimental

**Material and Methods:** Alkaline phosphatase (ALP) (EC 3.1.3.1, type I-S, from bovine intestinal mucosa), bovine serum albumin (BSA), p-nitrophenyl phosphate, tris-HCl buffer, glycine buffer were supplied by Sigma. Tetraethylorthosilicate (TEOS), Methyl triethoxysilane (MTES) and polyethylene glycol (PEG, MW 600) were purchased from Sigma.

The preparation of alkaline phosphatase, ALP, immobilized silica sol-gel materials followed procedures of Avnir *dkk.* [2], Keeling-Tucker *dkk.* [6], and Wei *dkk.* [5], with some modification.

### Preparation of polymer template containing silica sol-gel material.

In this work, PEG 600 and PVA 13,000–23,000 used as templates. Typically, TEOS was prehydrolyzed with water in ethanol using HCl as catalyst at [TEOS]:[H<sub>2</sub>O]:[EtOH]:[HCl] molar ratio of 1:4:3:0.0005 under magnetic stirring at room temperature. After 30 minutes, the precursors mixture became homogenous. The hydrolyzed solution was stored for 3 days in a freezer before use to ensure complete hydrolysis. Furthermore, the prehydrolyzed solution was added to a specific amount of aqueous template solution ranging from 10 to 40 wt%. The resultant homogenous sol was sealed with paraffin film containing several pinholes to allow for slow evaporation of solvents and reaction by products at room temperature.

To prepare the mesoporous silica material, the sample was ground and extracted with water to remove the template from the synthesized silica materials at room temperature. A certain amount of sample (e.g. 0.2–1.0 g depending on the template content) was ground into powder, which was soaked in 15 mL water under stirring for 30 minutes. After centrifugation and decantation, the sample was placed in another 15 mL of fresh water for 3 h. The mixture was again centrifuged and soaked in 15 mL water overnight. In the following two days, the sample was washed twice a day in the same manner. After extraction, the sample was dried at room temperature.

### Immobilisation of alkaline phosphatase in silica sol-gel material.

The ALP was added to the prehydrolyzed precursor before gelation. In a typical procedure for the preparation of enzyme-doped silica sol-gel: TEOS (2 mL) was mixed with H<sub>2</sub>O (0.48 mL) and HCl (0.015N, 16  $\mu$ L) in a flask under sonication at room temperature for 30 minutes. A volume of 1.5 mL hydrolyzed TEOS was then mixed with 2.5 mL of a tris-HCl buffer (40 mM, pH 8.5) containing ALP (a tris-HCl buffer solution containing ALP prepared by dissolving 2 mg of the ALP in tris-HCl buffer solution 40 mM, pH 8.5) and between 0 and 20 weight % of PEG or PVA solution. The mixture was placed in a flask that was then sealed with paraffin film and allowed to gel at room temperature. Upon gelation, several small holes were punched in the paraffin film to allow the evaporation to solvents and put into vacuum dessicator and continually evacuated

for 10 days at room temperature until constant weight was reached.

### Detection Method:

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to characterize the presence of specific chemical groups in the materials and to monitor the template removal. The as-synthesized and water extracted samples were milled and mixed with dried KBr powder. FTIR spectra were obtained within the range 4000 and 400 cm<sup>-1</sup>.

### Activity assay for free and entrapped enzyme.

General procedure for enzymatic activity assays of ALP in solution and in immobilized form were adapted from the literatures. Kinetic parameters for the free and immobilized enzymes were determined using Michaelis-Menten kinetic [5].

The initial activity of ALP was determined from the absorbance change at 405 nm by using a UV-Vis spectrometer. The absorbance increase was due to the formation of p-nitrophenol. For free ALP, 1 mL of the enzyme solution (containing 2  $\mu$ g ALP) was mixed with 1.46 mL of tris-HCl buffer and 0.3 mL of MgCl<sub>2</sub> 0.01M. After 30 minutes, 0.24 mL of p-nitrophenyl phosphate 0.1 M was added to initiate reaction, upon which the absorbance change with time was recorded. For immobilized ALP, all samples were first washed with dilute buffer solution before proceeding with the activity assay according to the following procedure. The sample (containing 0.08 units of ALP) was weighed into a tube and 10 mL tris-HCl buffer was added to soak the sample under agitation. After 1 h, the washed solution was separated from the solid by decantation after centrifugation. The washing procedure was repeated two more times at 1 h intervals. The ALP containing gel was then evaluated for the apparent activity following the same procedure as for the free ALP except substituting the enzyme solution with 1 mL of H<sub>2</sub>O. The sample was weighed into the assay mixture consisting of 1 mM of MgCl<sub>2</sub> and 40 mM of tris-HCl buffer pH 8.5. The assays were performed at room temperature.

The kinetic parameters were determined by varying the concentration of substrate, p-nitrophenyl phosphate (p-NPP), from 1 to 15 mM. The effect of pH on the catalytic activity of ALP in free and encapsulated form was evaluated by measuring initial velocity of the reaction in buffers at different pH using fixed concentration of p-NPP (8 mM). The buffers used were 40 mM tris-HCl buffers at pH values 7 to 8.5 at 0.5 intervals and glycine buffer for pH values 9 to 10.

## 3. Results and Discussion

The preparation of enzyme containing sol-gel materials was performed by adding the enzymes with PEG as template, into the hybrids TEOS-MTES derived sol before gelation, followed by aging and drying the gel to yield the transparent enzyme-containing glasses. The gelation time was shortened by the addition of the buffered enzyme solution which raised the pH of the mixture. The aging and drying process were accelerated

by using a vacuum dessicator to evacuate solvents and by-product of the sol-gel reaction without causing sample cracking which often occurs in a template free system.

The encapsulation of protein by sol-gel methods is commonly carried out through four stages, namely acid catalyzed hydrolysis of alkoxysilane precursors, addition of aqueous buffer solution containing protein, aging and drying to produce optically transparent glass materials with the protein entrapped [4, 5].

The structure and properties of doped sol-gels depend not only on the chemical composition of the starting materials, but also on many operational factors involved in the preparation. Upon immobilization, the entrapped biomolecules are expected to retain at least some of their functionality and storage stability. However, due to the complexity of the sol-gel reaction and the lack of fine structure control over the final product, it is desirable to develop a general approach for the synthesis of bio-doped sol-gel materials with reproducible performance and long term stability [1, 3].

A number of possibilities may occur to entrapped protein depending on the nature of the protein and the sol-gel precursors used, including homogeneously dispersing in the pore solvent, adsorbing into the silica surface, partitioning into specific phases within the nanocomposite materials, or aggregation. Jin dan Brennan [4] suggested that the entrapped protein are not simply present in solution-like environments but they can interact with matrix and show a distribution of dynamic motions, stabilities and binding constant that change as the material ages.

The entrapment of protein into a silica matrix can result in a range of possible environments for the entrapped protein.<sup>18</sup> Some of the proteins are entrapped in pores which are completely accessible to the analyte, some in the pores that are partially accessible, while the remainder of the protein may be sequestered into pores which are completely inaccessible. Pore sizes of the silica matrices and analyte-matrix interactions such as electrostatic, hydrogen bonding and hydrophobic interactions play an important role in determining the accessibility of an analyte to entrapped proteins [5, 6]. Therefore, in order to maximize the accessibility, some modifications should be employed including manipulation of sol-gel synthesis conditions, incorporation of polymer or other additives, manipulation of aging conditions to minimize silanol content, manipulation of pH conditions or use of templating agents to promote larger pores (mesopores) [5].

Non-ionic biocompatible compounds such as glycerol and d-glucose were used as pore templates for enzymes encapsulation, such as alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP) and horseradish peroxidase (HRP). The entrapped enzymes demonstrated much higher remaining activities (enzymatic activity is increased by a factor of 2 to 10) and thermal stability than in non-templated samples prepared under the same conditions.<sup>8</sup> While, uncharged

polymeric dopants, PVA and PEG were used as templates for lipase encapsulation. The entrapped lipase showed dramatically enhanced of enzymatic activity than in conventional encapsulation. Although immobilization of lipase was most successful, it was uncertain for the other enzymes because that biological molecules are not generic but form numerous classes of diverse compounds, which not only differ in their function but also in their structure and environment in vivo. Therefore, interested to study influence of addition PEG or PVA polymer in other enzyme encapsulation such as alkaline phosphatase. This enzyme has been used in biosensor for the determination of pesticides and heavy metals.

Enzymatic Reaction of alkaline phosphatase:

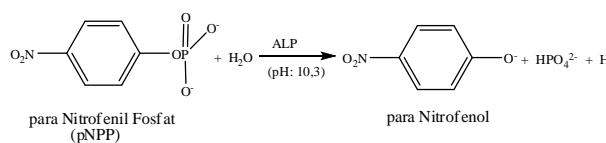


Table 1. BET surface area analysis datas

Sample	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Total pore volume (cm <sup>3</sup> /g)	Mean pore radius (Å)
Silika Gel (SG)	423	0,219	11,2
SG-MTES	391	0,208	14,4
SG-PEG	874	0,423	12,5

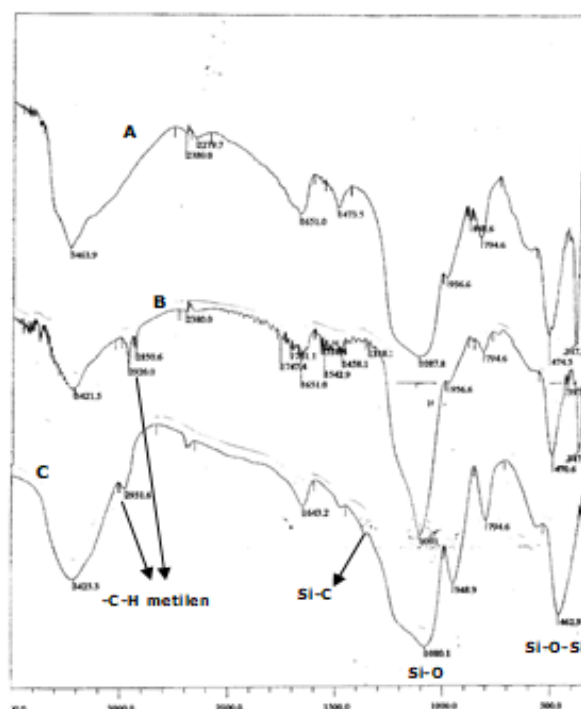


Figure 1. FTIR spectra from: A. Silika gel, B. Silika gel-PEG dan C. Silika gel-MTES.

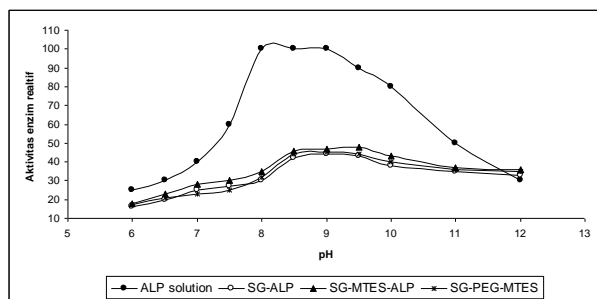


Figure 2. Influence of pH for enzymatic activity of ALP in silica-PEG and Silica-MTES.

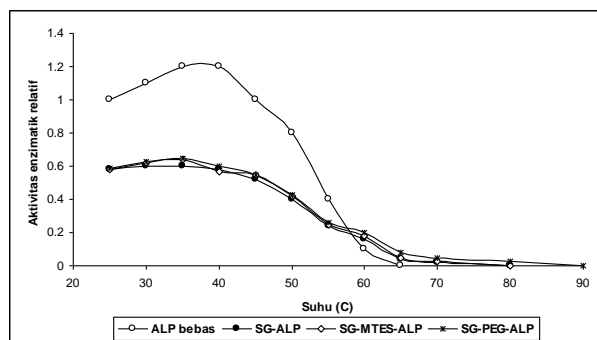


Figure 3. influence of temperature.

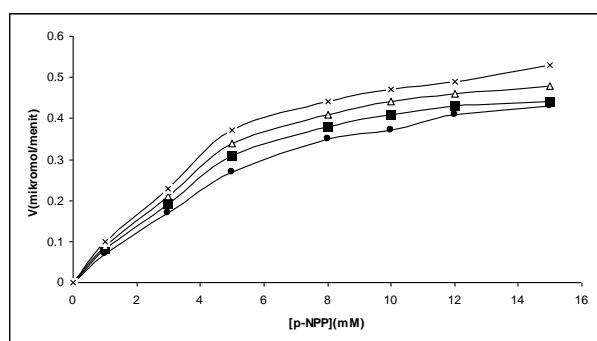


Figure 4. Michaelis-Menten curve for entrapped alkaline phosphatase in : (●) SG-ALP, (■) SG-5%PEG, (△) SG-10%PEG dan (x) SG-20%PEG.

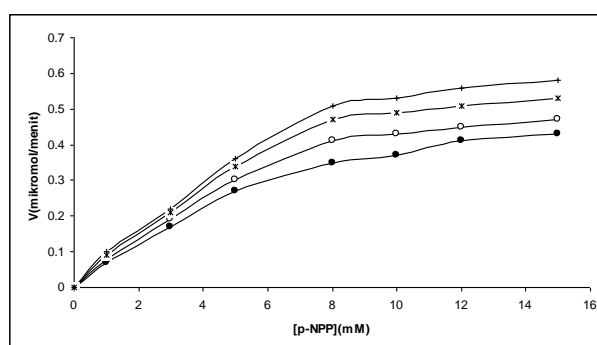


Figure 5. Michaelis-Menten curve from entrapped alkaline phosphatase in : (●) SG-ALP, (○) SG-10%MTES, (\*) SG-20%MTES dan (+) SG-40%MTES.

Table 2. enzymatic activity datas.

No.	ALP enzyme in:	Km (mM)	Vmax (μM/minute)	Spesific actv. (μmol menit <sup>-1</sup> / mg enzim)
1.	Solution	0,077	6,988	3,494
2.	SG	9,563	0,738	0,069
3.	SG-5%MTES	8,366	0,749	0,090
	SG-10% MTES	7,618	0,775	0,093
	SG-20% MTES	7,105	0,809	0,098
4.	SG- MTES-5%PEG	9,153	0,810	0,099
	SG-MTES-10%PEG	9,321	0,925	0,103
	SG-MTES-20%PEG	8,552	0,945	0,112

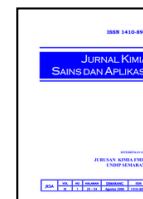
#### 4. Conclusion

Result showed that ALP encapsulated in the ethyl-silica hybrids with PEG dopant gave enzymatic activity as 0.112 U/mg enzyme, higher than ALP encapsulated in copolymerization of TEOS with MTES or in silica from TEOS precursor only (0.098 U/mg enzyme and 0.069 U/mg enzyme, respectively). It was shown that copolymerization of TEOS with organosilane precursor and the entrapment of polymer additives into sol-gel processed materials are usefull methods for modifying the internal environment and hence the activity of biomolecules entrapped in sol-gel derived biomaterials.

#### 5. References

- [1] John D. Brennan, Using Intrinsic Fluorescence to Investigate Proteins Entrapped in Sol-Gel Derived Materials, *Applied Spectroscopy*, 53, 3, (1999) 106A-121A <http://dx.doi.org/10.1366/0003702991946514>
- [2] David Avnir, Sergei Braun, Ovadia Lev, Michael Ottolenghi, Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials, *Chemistry of Materials*, 6, 10, (1994) 1605-1614 <http://dx.doi.org/10.1021/cm00046a008>
- [3] Bakul C. Dave, Bruce Dunn, Joan Selverstone Valentine, Jeffrey I. Zink, Sol-gel encapsulation methods for biosensors, *Analytical Chemistry*, 66, 22, (1994) 1120A-1127A <http://dx.doi.org/10.1021/ac00094a001>
- [4] Wen Jin, John D. Brennan, Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials, *Analytica Chimica Acta*, 461, 1, (2002) 1-36 [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00229-5)
- [5] 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)
- [6] Tracey Keeling-Tucker, Michael Rakic, Cassandra Spong, John D. Brennan, Controlling the Material Properties and Biological Activity of Lipase within Sol-Gel Derived Bioglasses via Organosilane and Polymer Doping, *Chemistry of Materials*, 12, 12, (2000) 3695-3704 <http://dx.doi.org/10.1021/cm000491m>





## Perbandingan Pembacaan Absorbansi Menggunakan Spectronic 20 D+ dan Spectrophotometer UV-Vis T 60U Dalam Penentuan Kadar Protein dengan Larutan Standar BSA

Sri Harjanto<sup>a\*</sup>

a Pranata Laboratorium Pendidikan, Departemen Kimia FSM UNDIP, Jl. Prof. H. Soedarto, S.H., Tembalang, Semarang 50275

\* Corresponding author: [sri.harjanto69@gmail.com](mailto:sri.harjanto69@gmail.com)

### Article Info

#### Keywords:

Protein, spectronic 20D +, UV-vis T60U spectrophotometer

#### Kata kunci:

Protein, spectronic 20D +, spectrophotometer UV-vis T60U

### Abstract

Comparative test was performed on Absorbance reading of Protein Protein Determination using Spectronic 20 D + and spectrophotometer uv-vis T 60U at 600 nm wavelength. Determination of protein content by lowry method was done by making standard solution with various concentration level, then from each concentration was taken 1 mL and added solution of lowry B, then left for 10 minutes and then added lowry solution A to be left for 20 minutes ago measured its absorbance at 600 nm wavelength. The result of measurement of absorbance using spectronic 20D + shows the value of  $R_2 = 0,9927$  while for Spectrophotometer uv-vis T 60U shows value  $R_2 = 0,9971$ . It can be concluded that the measurement of absorbance for both instruments did not differ significantly.

### Abstrak

Telah dilakukan uji perbandingan pada pembacaan Absorbansi dari penentuan kadar Protein menggunakan Spectronic 20 D+ dan spectrophotometer uv-vis T 60U pada panjang gelombang 600 nm. Penentuan kadar protein menurut metode lowry dilakukan dengan cara membuat larutan standar dengan berbagai tingkat konsentrasi, kemudian dari masing-masing konsentrasi tersebut diambil 1 mL dan ditambahkan larutan lowry B, kemudian dibiarkan selama 10 menit dan kemudian ditambahkan larutan lowry A untuk dibiarkan selama 20 menit lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Hasil penelitian pengukuran absorbansi menggunakan spectronic 20D+ menunjukkan nilai  $R_2 = 0,9927$  sedangkan untuk Spectrophotometer uv-vis T 60U menunjukkan nilai  $R_2 = 0,9971$ . Hal ini dapat disimpulkan bahwa pengukuran absorbansi untuk kedua instrumen tidak berbeda secara signifikan.

### 1. Pendahuluan

Protein merupakan senyawa organik kompleks yang mempunyai bobot molekul tinggi dan merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino. Protein terdapat hampir disegala macam makanan seperti susu, telur, daging, biji-bijian. Protein berfungsi bagi tubuh antara lain sebagai penyedia bahan-bahan untuk pertumbuhan, pemeliharaan sel-sel jaringan tubuh.

Ada berbagai cara untuk melakukan pengujian terhadap protein baik secara kualitatif maupun

kuantitatif. Adapun untuk uji kuantitatif bisa menggunakan metode Lowry.

Kandungan protein dari suatu sampel dapat dianalisis dengan bantuan menggunakan instrument spectronic 20D+ dan spectrophotometer uv-vis T60U. Untuk memperoleh keseksamaan hasil dari kedua instrumen tersebut maka perlu diadakan uji banding harga  $r$  dengan persamaan  $y=mx+c$

Pada Spectro sinar tampak seperti Spectronic 20D+ ini sumber cahaya biasanya menggunakan lampu tungsten atau lampu wolfram, jadi panjang gelombang



yang digunakan biasanya tinggi, maka data yang diperoleh biasanya makin akurat atau kesalahan yang muncul makin kecil. Berdasarkan hukum Lambert Beer: Absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi.

**2. Metodologi penelitian**

**Alat:** Dalam penelitian ini alat yang digunakan adalah Spectronic 20D+ merk Thermo scientific, Spectrophotometer uv-vis T60U merk PG Instrument Limited, Neraca analitik, inkubator, pH meter, almari pendingin dan seperangkat alat gelas. **Bahan:** Adapun untuk bahannya antara lain larutan standar BSA dengan berbagai konsentrasi, akuades, Larutan Lowry A, merupakan campuran larutan asam fosfo-tungstat-fosfo molibdat dengan akuades (1: 1). Larutan Lowry B, merupakan campuran 100 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % dalam larutan NaOH 0,1 N dengan 1 ml CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O 1 % dan 1 ml K-Na Tartrat 2 %.

**Eksperimen**

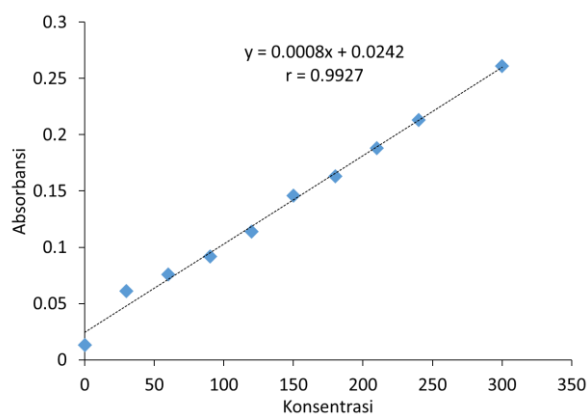
Metode Lowry, dengan cara membuat larutan standar protein, Bovine Serum Albumine (BSA) dengan berbagai tingkat konsentrasi dari 30-300 µg/ml, kemudian masing-masing diambil 1 ml .Masukan kedalam tabung reaksi . Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 8 ml reagen Lowry B dan biarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian tambahkan 1 ml reagen Lowry A, gojog dan biarkan selama 20 menit. Kemudian dibaca Absorbansi pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan Spectronic 20D+ dan Spectrophotometer uv-vis T60U.

**3. Hasil dan pembahasan**

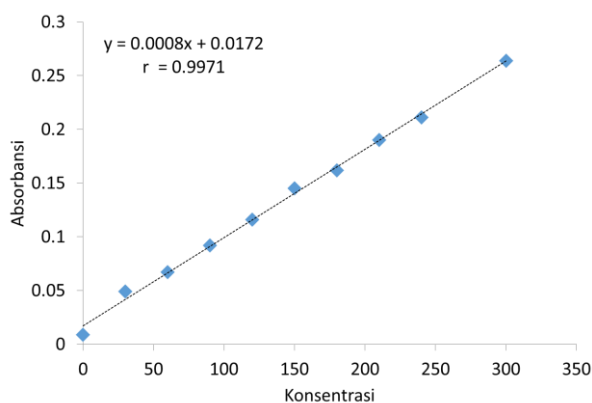
Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini persamaan  $y = mx+c$  dengan harga  $r = 0,9927$  untuk spectronic 20D+ dan harga  $r = 0,9971$  untuk spectrophotometer uv-vis T60U.. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pembacaan Absorbansi dengan menggunakan instrumen Spectronic 20 D+ dan Spectrophotometer uv-vis T60U mempunyai perbedaan harga r sebesar 0,0044. Harga ini sangat kecil

Tabel 1. Data pengamatan

No	Konsentrasi (µg/ml)	Pembacaan Absorbansi	
		Spectronic 20D+	Spectrophotometer UV-vis T60U
1	0	0,013	0,009
2	30	0,061	0,049
3	60	0,076	0,067
4	90	0,092	0,092
5	120	0,114	0,116
6	150	0,146	0,145
7	180	0,163	0,162
8	210	0,188	0,190
9	240	0,213	0,211
10	300	0,261	0,264
		$r = 0,9927$	$r = 0,9971$
		$Y = 0,0008 x + 0,0242$	$Y = 0,0008 x + 0,0172$



Gambar 1. Kurva standar dengan Spectronic 20D+



Gambar 2. Kurva standar dengan Spectrophotometer uv-vis T60U

Dalam uji protein dengan metode lowry yang perlu diperhatikan adalah penggunaan reagen lowry A dan lowry B harus dalam kondisi baru, karena mudah sekali rusak teroksidasi juga waktu pendiamannya harus tepat.

Demikian juga saat pembacaan Absorbansi dipilih dua buah kuvet yang mempunyai tingkat baca absorbansi yang sama atau hampir sama (untuk sampel dan blanko).

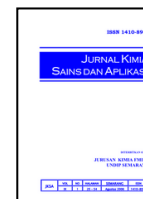
**4. Kesimpulan**

Dalam uji protein dengan menggunakan larutan standar BSA dan metode Lowry diperoleh hasil pembacaan dengan Spectronic D20+ harga  $r = 0,9927$  sedangkan dengan Spectrophotometer uv-vis T60U diperoleh harga  $r = 0,9971$ . Terpautnya harga r sebesar 0,0044 sangat kecil, sehingga dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini untuk pembacaan Absorbansi dari kedua instrumen tersebut tidak ada perbedaan secara signifikan .

**DAFTAR PUSTAKA**

Achmad H., (1992), *Kimia Unsur dan Radiokimia*. PT Citra Aditya Bakti, Bandung, halaman 122 - 123.  
 Scopes.K.Robert, 1982, *Protein Purification Principles and Practice*, Springer-Verlag New York and Heidelberg Berlin, 265.  
 Sudarmadji S. dkk, 1989, *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta, 145

- Mulyono HAM, (2005) *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*, PT Bumi Aksara, Jakarta, halaman 174
- Fri J. and Getrost H., (1975), *Organic Reagents for Trace Analysis*, E. Merck, Darmstadt. p 22 - 25.
- Miller J.C. and Miller J.N., (1988), *Statistics for Analytical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, New York, p 55-58.



## Triterpenoid dan Nanopartikel Ekstrak *n*-Heksana dari Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum) Serta Uji Sitotoksisitas dengan BSLT

Dian Nopitasari<sup>a\*</sup>, Enny Fachriyah<sup>a</sup>, Pratama Jujur Wibawa<sup>a</sup>

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

\* Corresponding author: [dianopitasari25@gmail.com](mailto:dianopitasari25@gmail.com)

### Article Info

Keywords:  
*Alpinia purpurata*,  
 triterpenoids,  
 nanoparticles,  
 cytotoxicity

Kata kunci:  
*Alpinia purpurata*,  
 triterpenoid,  
 nanopartikel,  
 sitotoksisitas

### Abstract

This study aimed to isolate triterpenoid compounds from the *Alpinia purpurata* rhizome and the fabrication of *n*-hexane extract nanoparticles and compare cytotoxic activity between nanoparticles and *n*-hexane extracts. Triterpenoid compounds were isolated from *n*-hexane extracts using gravitational column chromatography and Preparative TLC. The method used for fabrication of *n*-hexane extract into nanoparticles was sonication by using an ultrasonic processor. Determination of cytotoxic activity of *n*-hexane extract using BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method. GC-MS analysis of triterpenoid isolate showed that compound had a molecular weight of 426 g/mol which was thought to be a Lupeol. Based on particle size analysis using PSA instruments, *n*-hexane extract nanoparticles had a size of 278.0 nm. The result of cytotoxicity test of *n*-hexane extract and *n*-hexane extract nanoparticles yielded LC<sub>50</sub> of 109.668 ppm and 86.783 ppm respectively. The *n*-hexane extract in the form of nanoparticles could improve bioactivity.

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa triterpenoid dari rimpang *Alpinia purpurata* dan fabrikasi nanopartikel ekstrak *n*-heksana serta membandingkan aktivitas sitotoksik antara nanopartikel dan ekstrak *n*-heksana. Senyawa triterpenoid diisolasi dari ekstrak *n*-heksana menggunakan kromatografi kolom gravitasi dan KLT Preparatif. Metode yang digunakan untuk fabrikasi ekstrak *n*-heksana menjadi nanopartikel adalah sonikasi dengan menggunakan prosesor ultrasonik. Penentuan aktivitas sitotoksik ekstrak *n*-heksana menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Hasil analisis GC-MS isolat triterpenoid memiliki berat molekul sebesar 426 g/mol diduga merupakan senyawa Lupeol. Berdasarkan analisis ukuran partikel menggunakan instrumen PSA, nanopartikel ekstrak *n*-heksana memiliki ukuran 278,0 nm. Hasil uji sitotoksisitas ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana menghasilkan LC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 109,668 ppm dan 86,783 ppm. Ekstrak *n*-heksana dalam bentuk nanopartikel dapat meningkatkan bioaktivitas.

### 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang berada di kawasan tropis yang memiliki kekayaan alam berupa tanaman yang dapat digunakan sebagai obat. Salah satu tanaman tersebut adalah lengkuas merah. Tanaman

lengkuas termasuk dalam genus *Alpinia*, merupakan genus terbesar yang memiliki taksonomi paling kompleks pada famili Zingiberaceae [1]. Berdasarkan penelitian etnobotani, spesies *Alpinia* telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan di negara Asia [2]. *A. purpurata* memiliki aktivitas sebagai antioksidan,

antibakteri, larvasida, sitotoksik dan vasodilator [3]. Kandungan metabolit sekunder dalam lengkuas merah adalah flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid/steroid, dan saponin [4]. Penelitian mengenai triterpenoid dalam lengkuas merah masih sedikit dilakukan. Hal ini ditandai dengan publikasi yang masih sulit ditemukan, baik berupa jurnal maupun buku sehingga triterpenoid dari rimpang lengkuas merah dipilih dalam penelitian ini.

Nanopartikel merupakan suatu partikel berukuran 1-100 nm yang memiliki sifat-sifat bioaktivitas yang unggul dan unik jika dibandingkan dengan ukuran *bulk* nya [5]. Dalam konteks ini, sifat bioaktivitas senyawa diharapkan akan meningkat ketika berukuran nanopartikel. Penelitian Yariv *dkk.* [6] melaporkan bahwa aktivitas antibakteri penisilin sebelum dan sesudah berukuran nano meningkat. Fabrikasi nanopartikel dilakukan menggunakan metode sonikasi. Sedangkan penentuan aktivitas antioksidan vitamin B menggunakan metode *Electron paramagnetic spectroscopy* dihasilkan nanopartikel vitamin B memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan vitamin B bentuk *bulk* nya [6]. Hal ini menunjukkan bahwa metode sonikasi dapat memfabrikasi nanopartikel, dan dapat meningkatkan sifat bioaktivitasnya. Pembuatan nanopartikel ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah belum pernah dilakukan, sehingga pada penelitian ini akan dilakukan fabrikasi nanopartikel dengan harapan untuk meningkatkan sifat bioaktivitasnya. Nanopartikel ekstrak *n*-heksana yang dihasilkan dengan menggunakan metode sonikasi akan diuji aktivitas sitotoksiknya.

## 2. Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah alat gelas standar penelitian, lampu UV 254 nm dan 365 nm, satu set alat maserasi dan rotary evaporator Buchii, satu set alat penetasan telur *Artemia salina*, neraca analitik, botol vial, kolom kromatografi, chamber KLT, pipet tetes, pipa kapiler, GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometer*) QP2010S Shimadzu, prosesor ultrasonik dan PSA (*Particle Size Analyzer*) Horiba SZ-100.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk rimpang lengkuas merah, *n*-heksana teknis, pereaksi *Libermann-burchard*, pelarut *pro analysis* p.a (Merck) seperti kloroform, *n*-heksana, etil asetat, dan diklorometana, silika gel 60, plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> (Merck), plat KLT preparatif silika gel GF<sub>254</sub> 20x20 cm tebal 2,0 mm (Merck), garam krosok, tween 20, telur *Artemia salina*, aquabides dan *virgin coconut oil* (VCO).

### Persiapan Bahan

Sampel penelitian ini adalah rimpang lengkuas merah yang diperoleh dari daerah Jepara. Sebanyak 20 kg rimpang lengkuas merah dibersihkan dengan air untuk menghilangkan pengotor-pengotor kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, dan dihaluskan hingga menjadi serbuk.

### Skrining Fitokimia

Serbuk rimpang lengkuas merah dilakukan skrining fitokimia yaitu uji steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, dan tannin [7].

### Uji Triterpenoid dan Steroid

Serbuk rimpang lengkuas merah sebanyak 5 gram dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, kemudian disaring. Selanjutnya 5 mL filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Kemudian diberi 2 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru/hijau menunjukkan adanya steroid sedangkan terbentuknya warna merah/ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

### Isolasi Triterpenoid

Serbuk rimpang lengkuas merah sebanyak 2 kg dimaserasi dengan *n*-heksana, diuapkan hingga didapatkan ekstrak *n*-heksana dan ditimbang. Terhadap ekstrak *n*-heksana dilakukan uji triterpenoid dengan menggunakan pereaksi *Libermann-Burchard*.

### Pemisahan Triterpenoid

Pemisahan triterpenoid dari ekstrak *n*-heksana dilakukan dengan metode kromatografi kolom gravitasi. Untuk menentukan eluen yang cocok, dilakukan pemisahan dengan KLT terhadap ekstrak *n*-heksana menggunakan berbagai eluen. Ekstrak kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi yang didapatkan kemudian dilakukan KLT dan fraksi dengan pola noda yang sama digabungkan. Fraksi gabungan diuji triterpenoid dengan KLT berbagai eluen dan disemprot dengan pereaksi *Libermann-Burchard*. Fraksi yang mengandung triterpenoid dipisahkan dengan KLT Preparatif. Pita yang dominan dikerok dan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai. Pelarut kemudian diuapkan hingga dihasilkan kristal dan ditimbang.

### Uji Kemurnian

Senyawa Triterpenoid yang didapatkan dari KLT preparatif diuji kemurnian dengan KLT berbagai eluen dan KLT dua dimensi menggunakan berbagai eluen. Noda tunggal yang terbentuk menunjukkan bahwa isolat triterpenoid telah murni.

### Karakterisasi dan Analisis Triterpenoid

Karakterisasi struktur triterpenoid dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS).

### Fabrikasi Nanopartikel Ekstrak *n*-heksana

Ekstrak *n*-heksana sebanyak 10 mg ditambahkan 6 mL aquabides dan 1 tetes VCO kemudian diultrasonikasi menggunakan prosesor ultrasonik dengan tegangan 220 volt, daya 50 watt, dan frekuensi 40 KHz selama 30 menit. Analisis nanopartikel ekstrak *n*-heksana dilakukan menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*).

### Uji Sitotoksitas [8]

Untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana digunakan metode BSLT. Sebanyak 38 gram garam krosok ditambahkan 1 liter aquades, kemudian disaring dan ditempatkan dalam aquarium yang terbagi menjadi 2 bagian (gelap dan terang). Pada bagian gelap aquarium ditambahkan telur *Artemia salina*. Larva *Artemia salina* siap digunakan dalam umur 2 hari. Dibuat larutan ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana dengan konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm dan 10 ppm. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 10 ekor larva *Artemia salina* dan diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam kemudian diamati kematian larva *Artemia salina*.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### Skrining Fitokimia Rimpang Lengkuas Merah

Dari penelitian dilakukan skrining fitokimia terhadap rimpang lengkuas merah yang memberikan hasil positif terhadap senyawa metabolit sekunder yaitu steroid, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Sedangkan ekstrak *n*-heksana memberikan hasil positif terhadap triterpenoid dan steroid. Menurut Oirere dkk. [4] kandungan metabolit sekunder *Alpinia purpurata* adalah flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid, steroid, dan saponin.

### Isolasi Triterpenoid

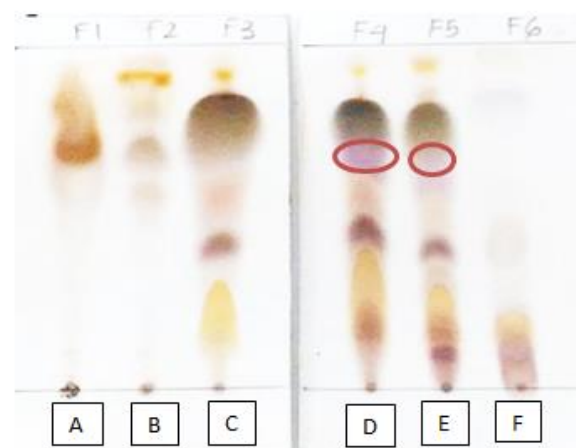
Ekstrak *n*-heksana yang didapatkan setelah maserasi menggunakan *n*-heksana dan diuapkan menggunakan rotary evaporator dihasilkan ekstrak *n*-heksana sebesar 15,56 gram (0,78%) dengan warna ekstrak kuning kecoklatan. Setelah didapatkan ekstrak *n*-heksana selanjutnya dilakukan uji triterpenoid dengan menggunakan pereaksi *Liebermann-Burchard* untuk memastikan kandungan triterpenoid yang ada dalam ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah. Hasil uji ekstrak *n*-heksana dengan pereaksi *Liebermann-burchard* menghasilkan warna merah, hal ini menunjukkan ekstrak *n*-heksana mengandung senyawa triterpenoid.

### Pemisahan Triterpenoid

Ekstrak *n*-heksana dilakukan uji KLT dengan berbagai eluen organik tunggal maupun campuran seperti kloroform, *n*-heksana, etil asetat, diklorometana, benzena dan campuran berbagai eluen dengan perbandingan tertentu. Hal ini untuk mengetahui jumlah komponen dan mencari eluen terbaik yang akan menjadi dasar pemisahan senyawa dalam kromatografi kolom gravitasi. Berdasarkan hasil KLT dari berbagai eluen belum dihasilkan pemisahan noda yang baik, sehingga dalam kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen dengan gradien kepolaran dari non polar ke polar. Eluen yang digunakan dimulai dari *n* heksana, kloroform dan etil asetat. Pemisahan senyawa triterpenoid dari ekstrak *n*-heksana menggunakan kromatografi kolom gravitasi menghasilkan 275 fraksi kecil yang masing-masing ditampung dalam botol vial 15 mL. Dari pengelompokan fraksi kecil diperoleh 6

fraksi besar dengan pola noda yang berbeda yaitu A, B, C, D, E, dan F.

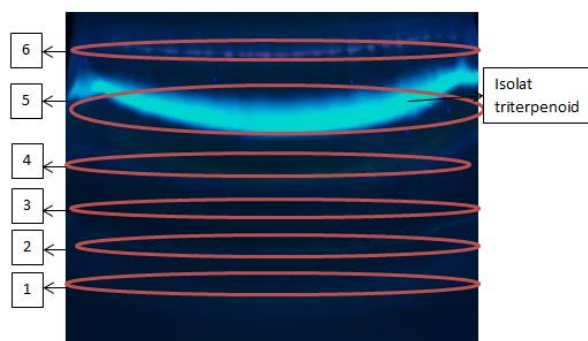
Identifikasi triterpenoid dilakukan terhadap fraksi A-F dengan menggunakan penampak bercak *Liebermann Burchard*. Terhadap 6 fraksi (A, B, C, D, E, dan F) hasil kolom dilakukan uji triterpenoid dengan disemprot menggunakan reagen *Liebermann Burchard* kemudian dipanaskan selama beberapa menit maka akan tampak noda berwarna ungu ditunjukkan pada gambar.1.



Gambar 1. Hasil uji triterpenoid fraksi besar A, B, C, D, E, dan F setelah disemprot reagen LB dengan eluen kloroform tampak visual

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa fraksi D dan E memberikan warna noda ungu sehingga fraksi tersebut positif mengandung triterpenoid. Fraksi D dan E kemudian digabungkan menjadi fraksi T, tahap selanjutnya adalah dilakukan isolasi triterpenoid dengan menggunakan KLT preparatif. Hasil KLT preparatif fraksi T menggunakan eluen kloroform: *n*-heksana (9:1) disajikan pada gambar 2.

Fraksi T yang positif mengandung senyawa triterpenoid yaitu pada kemudian dipisahkan dengan KLT preparatif menggunakan eluen kloroform : *n*-heksana (9 : 1). Hasil KLT preparatif dapat dilihat pada gambar 2.

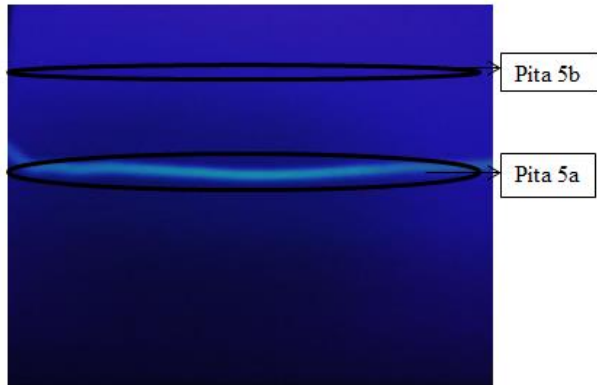


Gambar 2. Hasil KLT Preparatif fraksi T dengan eluen kloroform : *n*-heksana (9 : 1) pada lampu uv 365 nm

Dari hasil KLT Preparatif diperoleh 6 pita, pita yang positif mengandung triterpenoid terdapat pada pita 5 ( $R_f$  0,74) selanjutnya dikerokan. Silika hasil pengerokan

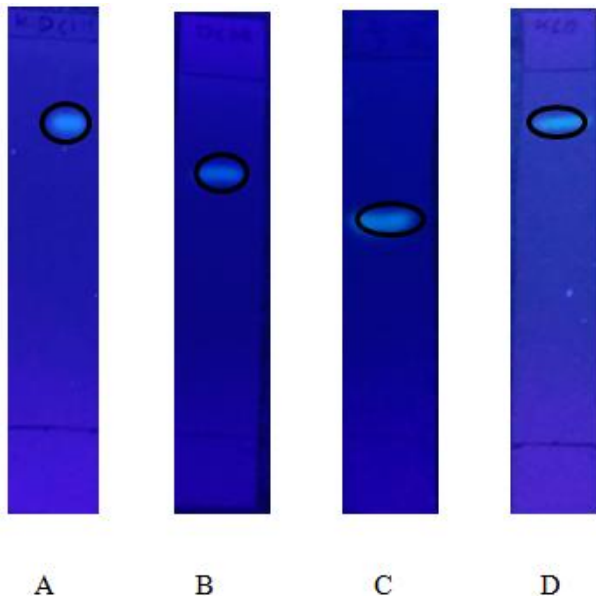


dilarutkan dalam kloroform, disaring dan diuapkan sehingga didapatkan isolat triterpenoid. Setelah didapat isolat triterpenoid selanjutnya dilakukan uji kemurnian pita 5. Dari hasil pengujian dihasilkan 2 noda yang menandai bahwa pita 5 belum murni. Pita 5 dipisahkan kembali dengan KLT preparatif menggunakan eluen kloroform : diklorometana ( 3 : 7) yang hasilnya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil KLT Preparatif pita 5 dengan eluen kloroform: diklorometana (3 : 7) pada lampu uv 365 nm

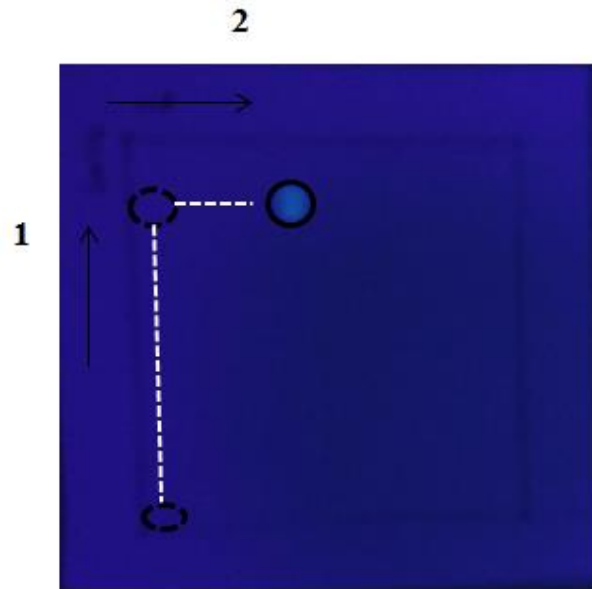
Hasil pemisahan ini diperoleh dua pita yang telah terpisah dengan baik yang teramati pada lampu uv 365 nm, dari kedua pita tersebut pita yang positif mengandung triterpenoid adalah pita 5a. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian terhadap pita 5a. Uji kemurnian isolat triterpenoid dilakukan uji KLT dengan berbagai eluen dan KLT dua dimensi, isolat dikatakan murni apabila memberikan noda tunggal. Uji kemurnian isolat triterpenoid dilakukan dengan berbagai eluen yang dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil uji kemurnian isolat 5a dengan berbagai eluen pada lampu uv 365 nm

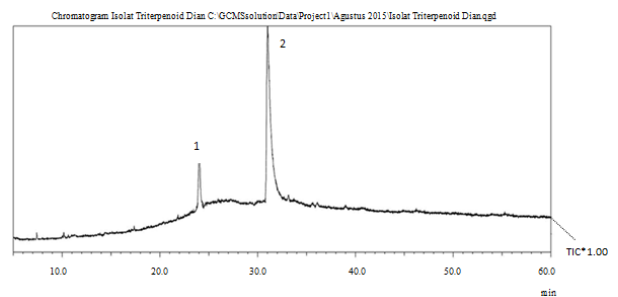
Keterangan : Eluen yang digunakan adalah A. Diklorometana: kloroform ( 1 : 1); B. Diklorometana; C. Diklorometana : n-heksana ( 2 : 1); dan D. Kloroform.

Uji kemurnian juga dilakukan dengan menggunakan KLT dua dimensi. Eluen yang digunakan pada penotolan pertama dan eluen kedua setelah diputar 90° berbeda. Untuk eluen pertama menggunakan diklorometana dan campuran yang kedua menggunakan kloroform : diklorometana ( 1 : 2). Hasil KLT dua dimensi menunjukkan bahwa isolat triterpenoid diduga telah murni karena menunjukkan satu noda yang dapat dilihat pada gambar 5.



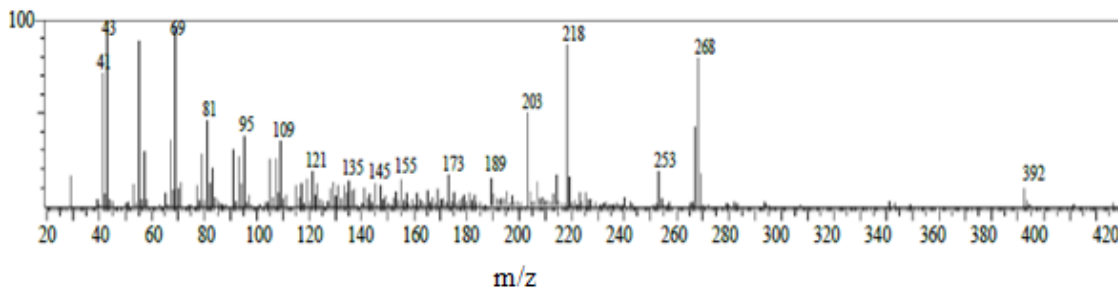
Gambar 5. Hasil KLT dua dimensi isolat triterpenoid dengan eluen 1. Diklorometana dan 2. Kloroform : diklorometana ( 1 : 2) pada lampu uv 365 nm

Isolat triterpenoid diidentifikasi menggunakan GC-MS, untuk mengetahui perkiraan struktur senyawa triterpenoid pada isolat. Data kromatogram isolat ditampilkan pada Gambar 6.

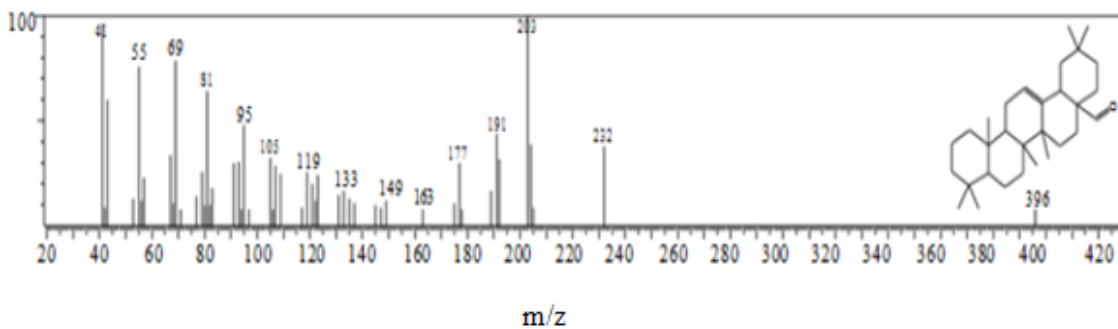


Gambar 6. Kromatogram isolat triterpenoid rimpang lengkuas merah

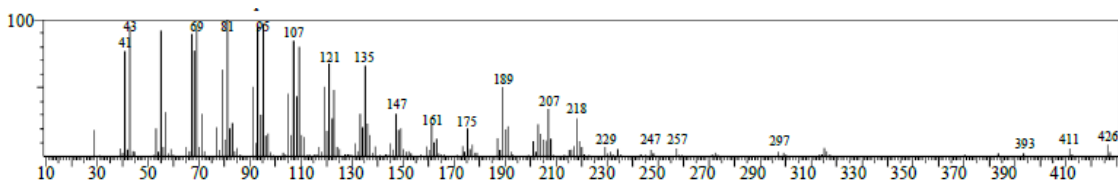
Hasil analisis menggunakan GC menunjukkan bahwa isolat belum murni dengan adanya 2 puncak dan waktu retensi yang berbeda. Puncak pertama memiliki waktu retensi 24,850 menit dengan kelimpahan sebesar 15,94%. Berdasarkan data yang diperoleh dari database GC-MS, Spektogram massa isolat puncak pertama ditampilkan pada Gambar 7, sedangkan spektogram massa senyawa Olean-12-en-28-al pada database GC-MS ditampilkan pada Gambar 8.



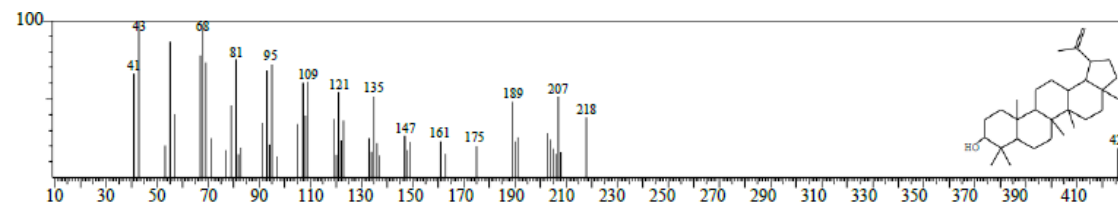
Gambar 7. Spektrogram massa isolat puncak pertama



Gambar 8. Spektrogram massa senyawa Olean-12-en-28-al pada database



Gambar 9 Spektrogram massa isolat puncak kedua



Gambar 10 Spektrogram massa Lupeol pada database

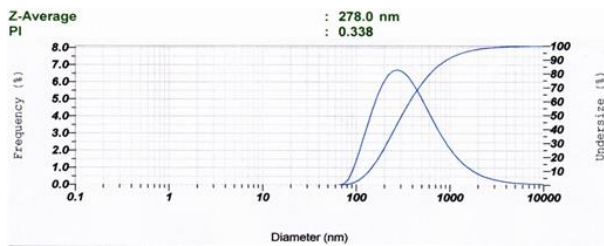
Senyawa puncak pertama pada database GC-MS senyawa diduga merupakan senyawa Olean-12-en-28-al dengan similarity index 68%. Senyawa puncak pertama memiliki kelimpahan dan similarity index lebih kecil dari senyawa puncak kedua, sehingga senyawa puncak kedua yang merupakan senyawa terbesar isolat dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui struktur senyawanya. Senyawa pada puncak kedua memiliki waktu retensi 31,053 menit dengan kelimpahan sebesar 86,04%. Berdasarkan hasil yang diperoleh dari database, Spektrogram massa isolat puncak kedua ditampilkan pada Gambar 9, sedangkan spektrogram massa senyawa Lupeol pada database GC-MS ditampilkan pada Gambar 10.

Spektrum massa senyawa puncak kedua memiliki berat molekul sebesar 426 g/mol menunjukkan pola fragmentasi sebagai berikut:  $m/z$  426[M<sup>+</sup>]; 411; 393; 257; 218; 207; 189; 175; 161; 147; 135; 121; 107; 95; 81; 69; 43; 41. Spektrogram isolat dan senyawa dari database

menunjukkan berat molekul dan pola fragmentasi yang mirip dengan similarity index 91 % dengan Lupeol, diduga senyawa isolat dan senyawa dari database identik. Penelitian oleh Sravani dkk. [9] melaporkan telah berhasil mengisolasi Lupeol dari famili Zingiberaceae. Berdasarkan analisis data di atas diusulkan senyawa hasil isolasi adalah senyawa golongan triterpenoid yaitu Lupeol.

#### Fabrikasi Nanopartikel Ekstrak *n*-heksana

Pembuatan nanopartikel ekstrak *n*-heksana menggunakan metode sonikasi bertujuan untuk mengetahui ukuran ekstrak yang telah berukuran nano menggunakan alat PSA, serta membandingkan kemampuan bioaktivitasnya sebelum dan setelah berukuran nano. Ukuran nanopartikel ekstrak *n*-heksana yang dihasilkan dari fabrikasi dapat ditentukan. Hasil pengukuran menggunakan PSA dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Hasil analisis menggunakan PSA

Berdasarkan analisis menggunakan PSA, terdapat satu puncak yang menunjukkan adanya satu kelompok distribusi persebaran partikel (monodisperse). Dari hasil grafik di atas, berdasarkan perhitungan rata-rata (Z-Average) diketahui bahwa ukuran rata-rata distribusi nanopartikel ekstrak *n*-heksana adalah 278,0 nm dengan frekuensi 6,706 % dan prosentase kumulatif sebesar 44,706 %. Hasil ukuran rata-rata distribusi partikel ekstrak *n*-heksana adalah 278,0 nm, sehingga dari ukuran tersebut belum didapatkan ukuran partikel dalam orde nanometer yaitu dari 1-100 nm. Hal ini kemungkinan dikarenakan waktu yang digunakan dalam proses sonikasi kurang lama yang menyebabkan ukuran partikel masih besar.

Uji Sitotoksisitas

Hasil uji sitotoksisitas ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksisitas ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana lengkuas merah

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Nau-philus Uji	1		2		3	
			Mati	Hidup	Mati	Hidup	Mati	Hidup
Kontrol	0	30	0	10	0	10	0	10
	10	30	3	7	3	7	2	8
Ekstrak <i>n</i> -heksana	100	30	5	5	5	5	3	7
	1000	30	10	0	10	0	10	0
Nanopartikel ekstrak <i>n</i> -heksana	10	30	4	6	3	7	3	7
	100	30	7	3	5	5	6	4
	1000	30	10	0	10	0	10	0

Berdasarkan data yang diperoleh, hasil analisis probit aktivitas sitotoksik ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana menggunakan program SPSS menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 109,668 ppm dan 86,783 ppm. Hasil yang diperoleh pada nanopartikel ekstrak *n*-heksana memiliki nilai LC<sub>50</sub> yang lebih kecil dibandingkan ekstrak *n*-heksana yang berukuran *bulk*. Hal ini disebabkan senyawa yang berukuran nano memiliki luas permukaan yang kecil sehingga akan mengalami peningkatan kemampuan bioaktivitas karena adanya suatu pengaruh, partikel akan naik ke permukaan ketika materi berukuran 1-100 nm, sehingga larutan akan dipengaruhi oleh sifat-sifat permukaannya yaitu ukuran dan bentuk bukan komposisi larutannya [10].

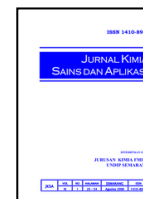
4. Kesimpulan

Hasil analisis MS isolat triterpenoid dari ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata*)

terdapat senyawa triterpenoid yang memiliki berat molekul 426 g/mol diduga merupakan triterpenoid Lupeol. Sintesis nanopartikel ekstrak *n*-heksana rimpang lengkuas merah dapat dilakukan dengan metode sonikasi dihasilkan partikel berukuran 278,0 nm. Nanopartikel ekstrak *n*-heksana memiliki aktivitas sitotoksik lebih besar daripada senyawa *bulk* nya, hal ini ditunjukkan hasil LC<sub>50</sub> ekstrak *n*-heksana dan nanopartikel ekstrak *n*-heksana berturut-turut sebesar 109,668 ppm dan 86,783 ppm.

5. Daftar Pustaka

- [1] W. John Kress, Ai-Zhong Liu, Mark Newman, Qing-Jun Li, The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers, *American journal of botany*, 92, 1, (2005) 167-178 <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.1.167>
- [2] S. Ghosh, L. Rangan, *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics, *3 Biotech*, 3, 3, (2013) 173-185 <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0089-x>
- [3] Eric Wei Chiang Chan, Siu Kuin Wong, Phytochemistry and pharmacology of ornamental gingers, *Hedychium coronarium* and *Alpinia purpurata*: a review., *Journal of Integrative Medicine*, 13, 6, (2015) 368-379 [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4064\(15\)60208-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-4064(15)60208-4)
- [4] Enock Kiage Oirere, Palanirajan Anusooriya, Chinthamony Arul Raj, Velliyur Kanniappan Gopalakrishnan, Phytochemical Analysis of *N-Hexane Leaf Extract of Alpinia Purpurata* (Vieill.) K. Schum Using Uv-Vis, FTIR and GC-MS, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7, 8, (2015) 387-389
- [5] R. Kelmani Chandrakanth, C. Ashajyothi, A. K. Oli, C. Prabhurajeshwar, Potential Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles Synthesised from *Enterococcus* Species, *Oriental Journal of Chemistry*, 30, 3, (2014) 1253-1262 <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/300341>
- [6] Inbar Yariv, Anat Lipovsky, Aharon Gedanken, Rachel Lubart, Dror Fixler, Enhanced pharmacological activity of vitamin B(1)(2) and penicillin as nanoparticles, *International journal of nanomedicine*, 10, 1, (2015) 3593-3601 <https://doi.org/10.2147/IJN.S82482>
- [7] Norman R. Farnsworth, Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, 225-276 [10.1002/jps.2600550302](http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600550302)
- [8] M. J. Moshi, E. Innocent, J. J. Magadula, D. F. Otieno, A. Weisheit, P. K. Mbabazi, R. S. Nondo, Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, north western Tanzania, *Tanzania journal of health research*, 12, 1, (2010) 63-67
- [9] T. Sravani, Padmaa M. B. Paarakh, A. Vedamurthy, Isolation of Phytoconstituents from the rhizomes of *Hedychium spicatum* Buch. Ham, *Journal of Pharmacy Research*, 5, 1, (2012) 526
- [10] Stephanie M Reimann, Matti Manninen, Electronic structure of quantum dots, *Reviews of Modern Physics*, 74, 4, (2002) 1283



## Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Senna siamea* Lamk)

Dita Widia Ningrum<sup>a\*</sup>, Dewi Kusriani<sup>a</sup>, Enny Fachriyah<sup>a</sup>

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

\* Corresponding author: [ditawidian@gmail.com](mailto:ditawidian@gmail.com)

### Article Info

Keywords:  
 Johar leaves,  
 Flavonoids,  
 Antioxidant

Kata kunci:  
 Daun johar,  
 Flavonoid,  
 Antioksidan

### Abstract

This research is conducted about the isolation flavonoid compounds from ethanol extract of johar leaves (*Senna siamea* Lamk) and antioxidant activity test. This study aims to obtain flavonoid isolate, identify and test the antioxidant activity of flavonoid isolate from ethanol extract of johar leaves. Research methods divided into four stages, the first stage is isolation of flavonoid compounds. The second stage is the separation of flavonoid compounds using vacuum liquid chromatography, gravitational column chromatography and preparative thin layer chromatography. The third stage is identification of flavonoid isolate using UV-Vis spectrophotometer and FTIR. The fourth stage is antioxidant activity test by DPPH method. The result of flavonoid isolation was found flavonoid isolate weighing 0.006 gram (0.004%). Identification of flavonoid isolate using UV-Vis spectrophotometer showed that flavonoid isolate has the basic structure of flavon compound with maximum absorption at wavelength band I (350 nm) and band II (255 nm and 267 nm) and analysis using FTIR showed flavonoid isolate has functional groups such as O-H, C-H aliphatic, C=O, C=C aromatic, C-O ether and C-O alcohol so that the flavonoid isolate has the basic structure of the substituted luteolin compound. The result of antioxidant activity from flavonoid isolate showed IC<sub>50</sub> value is 139.8373 mg / L.

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol daun johar (*Senna siamea* Lamk) serta uji aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat flavonoid, mengidentifikasi dan menguji aktivitas antioksidan isolat flavonoid dari ekstrak etanol daun johar. Metode penelitian dibagi menjadi empat tahap, tahap pertama yaitu isolasi senyawa flavonoid. Tahap kedua yaitu pemisahan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi cair vakum, kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi lapis tipis preparatif. Tahap ketiga yaitu identifikasi isolat flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Tahap keempat adalah uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hasil isolasi flavonoid didapatkan isolat flavonoid seberat 0,006 gram (0,004%). Identifikasi isolat flavonoid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa isolat flavonoid memiliki struktur dasar senyawa flavon dengan serapan maksimum pada panjang gelombang pita I (350 nm) dan pita II (255 nm dan 267 nm) dan analisis menggunakan FTIR menunjukkan isolat flavonoid memiliki gugus fungsi O-H, C-H alifatik, C=O, C=C aromatik, C-O eter dan C-O alkohol sehingga diduga isolat flavonoid memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid menunjukkan IC<sub>50</sub> sebesar 139,8373 mg/L.



## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang terletak di kawasan tropis yang terkenal dengan kekayaan alamnya yaitu terdapat berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat obat. Keampuhan pengobatan secara tradisional banyak dibuktikan melalui berbagai pengalaman. Salah satu tanaman yang digunakan dalam pengobatan tradisional adalah tanaman *Senna siamea* Lamk atau yang dikenal sebagai tanaman Johar [1]. Tanaman johar telah digunakan secara tradisional sebagai obat penyakit kuning, sakit perut, nyeri haid, dan juga digunakan untuk mengurangi kadar gula dalam darah [2]. Ekstrak daun johar dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai antimalaria, antioksidan [1], antibakterial [3] dan antidiabetes [4]. Penelitian lain melaporkan dalam ekstrak metanol, etanol, dan etil asetat dari daun johar mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol, antrakuinon, antosianin, dan glikosida jantung [5]. Jenis flavonoid yang berhasil diisolasi dari ekstrak etanol daun johar adalah luteolin [6]. Uji aktivitas antioksidan dari isolat flavonoid ekstrak etanol daun johar belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol daun johar serta uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

## 2. Metode Penelitian

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun johar (*Senna siamea* Lamk), etanol 96%, etil asetat teknis, n-heksana teknis, eter teknis, butanol teknis, etil asetat p.a. (Merck), etanol p.a. (Merck), n-heksana p.a. (Merck), akuades, asam klorida 2 N (Merck), besi (III) klorida p.a., serbuk magnesium, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, pereaksi Libermann-Buchard, amil alkohol, amoniak 25% (Merck), kloroform p.a. (Merck), besi (III) klorida 1%, asam sulfat pekat 10% (Merck), metanol p.a. (Merck), plat KLT silika gel 60 GF254 (Merck), plat KLT silika gel F254 20x20 cm tebal 2,0 mm (Merck), silika gel 60 GF (Merck), silika gel 60 H (Merck), DPPH (*1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Sigma-Aldrich), dan kuersetin (Sigma-Aldrich).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari erlenmeyer, pipet tetes, gelas beker, corong gelas, corong pisah, botol vial, pipa kapiler, tabung reaksi, pengaduk kaca, penangas air, cawan penguap, wadah pengembang, blender, kertas saring, lampu detektor UV 254 nm dan 365 nm (CAMAG UV Cabinet 4), rotary vacuum evaporator (Buchi-B480), satu set alat kromatografi cair vakum, satu set alat kromatografi kolom gravitasi, neraca analitik (Kern-870), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1280), FTIR (Perkin Elmer 10.4.00).

### Preparasi dan Penapisan fitokimia

Sampel penelitian berupa daun johar yang diperoleh dari daerah Purworejo. Daun johar yang diperoleh

dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk dan diuji penapisan fitokimia.

### Isolasi Flavonoid

Sebanyak 1475 gram serbuk daun johar dimaserasi dengan etanol 96% hingga jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dievaporasi sampai mendapat ekstrak etanol dan ditimbang. Ekstrak etanol dilarutkan dalam etanol selanjutnya dilakukan penghilangan klorofil dengan menambahkan akuades (1:1), didiamkan selama 24 jam, lalu disaring. Filtrat diekstraksi dengan n-heksana. Fraksi etanol-air dihidrolisis dengan HCl 2 N selama 1 jam dalam suhu 85°C [7]. Fraksi hasil hidrolisis difraksinasi dengan etil asetat hingga didapatkan fraksi etil asetat kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya lalu ditimbang.

### Pemisahan Flavonoid

Fraksi etil asetat sebanyak 7,95 gram dilakukan pemisahan flavonoid dengan kromatografi cair vakum menggunakan fasa diam silika gel 60 GF254 dan fasa gerak menggunakan gradien tingkat kepolaran [7]. Fasa gerak yang digunakan yaitu kloroform, etil asetat dan etanol. Eluat-eluat yang dihasilkan dari kolom ditampung setiap 100 mL dalam botol vial. Masing-masing botol vial dianalisis menggunakan KLT dengan penambahan penampak bercak uap amoniak. Eluat-eluat yang menghasilkan pola noda yang sama digabungkan menjadi satu (Fraksi I). Fraksi I dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan fasa diam silika gel 60 H dan fasa gerak berupa campuran kloroform, etil asetat, butanol (7:2,5:0,5). Eluat-eluat yang dihasilkan dari kolom ditampung setiap 15 mL dalam botol vial. Masing-masing botol vial dianalisis dengan KLT. Eluat-eluat yang menghasilkan pola noda yang sama digabungkan menjadi fraksi-fraksi besar (fraksi besar A,B,C,D,E, dan F) kemudian dilakukan analisis flavonoid menggunakan metode KLT dengan penambahan penampak bercak uap amoniak. Fraksi positif flavonoid dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan fasa diam plat silika gel 60 F254 ukuran 20 cm x 20 cm, ketebalan 0,5 mm-2,0 mm dan fasa gerak berupa campuran kloroform: metanol (9:1) hingga didapatkan isolat flavonoid.

### Uji Kemurnian

Uji kemurnian isolat flavonoid dilakukan dengan KLT berbagai eluen tunggal dan campuran serta KLT dua dimensi dengan eluen campuran hingga diperoleh noda tunggal.

### Identifikasi Struktur

Isolat flavonoid yang telah murni diidentifikasi strukturnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### Uji Aktiviitas Antioksidan

Isolat flavonoid dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode KLT. Sampel ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan fasa



gerak yang cocok. Lempong plat dikeringkan dan disemprot dengan larutan DPPH 0,1 mM. Pengujian aktivitas antioksidan terhadap isolat flavonoid dilanjutkan dengan metode DPPH dan digunakan kuersetin sebagai pembanding. Isolat flavonoid dibuat variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi dari isolat flavonoid sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,1 mM. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruangan gelap, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515,5 nm. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap kuersetin dengan variasi konsentrasi (5, 10, 15, 20 dan 25 ppm). Nilai absorbansi dari larutan uji dengan berbagai konsentrasi digunakan untuk menghitung aktivitas peredaman radikal DPPH (% inhibisi) dengan menggunakan persamaan berikut

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A \text{ kontrol (DPPH)} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol (DPPH)}} \times 100\%$$

Besarnya aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC50 yang dihitung dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier dengan sumbu x adalah konsentrasi larutan uji, sedangkan sumbu y adalah persentase aktivitas peredaman radikal DPPH (% inhibisi). Nilai IC50 merupakan konsentrasi sampel untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun johan. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji penapisan fitokimia serbuk dan ekstrak etanol daun johan

Uji	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak Etanol
Flavonoid	+	+
Alkaloid	+	+
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kuinon	+	+

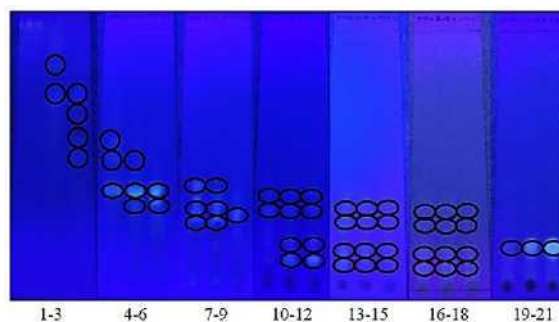
#### Isolasi Flavonoid

Serbuk daun johan sebanyak 1475 gram setelah dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, disaring dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental etanol berwarna coklat kehitaman pekat sebanyak 133,33 gram (8,89%). Ekstrak kental etanol setelah dihilangkan klorofilnya menghasilkan fraksi etanol-air, kemudian difraksinasi menggunakan n-heksana. Fraksi etanol-air hasil fraksinasi dihidrolisis dengan metode refluks menggunakan HCl 2 N yang bertujuan untuk memutus ikatan O-glikosida pada kerangka flavonoid, sehingga terbentuk flavonoid bebas dan gula. Flavonoid bebas

dalam campuran dapat diambil dengan fraksinasi menggunakan etil asetat. Fraksi etil asetat diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan didapatkan fraksi etil asetat sebanyak 7,95 gram (0,53%).

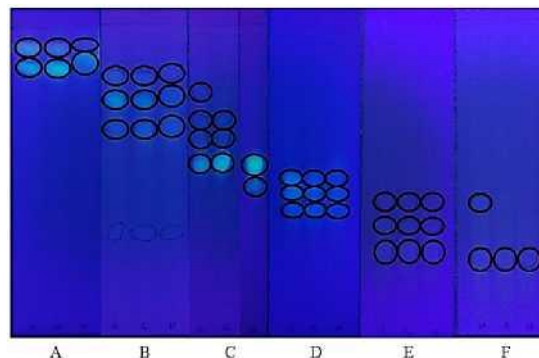
#### Pemisahan Flavonoid dan Uji Kemurnian

Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum dengan fasa diam silika gel 60 GF254 dan fasa gerak berdasarkan gradien tingkat kepolaran, dimulai dari kloroform/etil asetat, etil asetat, dan etil asetat/etanol. Eluat yang dihasilkan sebanyak 21 botol vial, kemudian masing-masing botol vial dianalisis dengan KLT menggunakan fasa gerak kloroform: etil asetat (7:3) yang ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Profil KLT fraksi etil asetat daun johan dengan kromatografi cair vakum menggunakan fasa gerak kloroform: etil asetat (7:3) pada UV X 365 nm

Fraksi 10-21 digabung menjadi satu (Fraksi I) karena memiliki kemiripan pola noda dan juga menunjukkan positif flavonoid pada penampak bercak uap amoniak. Fraksi I dilakukan pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5) dan fasa diam berupa silika gel 60 H. Eluat yang dihasilkan sebanyak 61 botol vial. Masing-masing botol vial tersebut dianalisis menggunakan KLT dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5). Hasil KLT diberi penampak bercak uap amoniak, yang mempunyai pola noda yang sama digabung dan diperoleh 6 fraksi besar yaitu fraksi A,B,C,D,E dan F seperti yang ditunjukkan pada gambar 2 dan tabel 2.

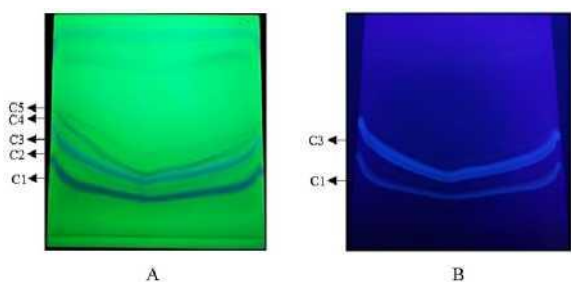


Gambar 2. Profil KLT fraksi I hasil kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform:etil asetat:butanol (7:2,5:0,5) pada UV X 365 nm

Tabel 2. KLT fraksi I hasil kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5) pada UV X 365 nm

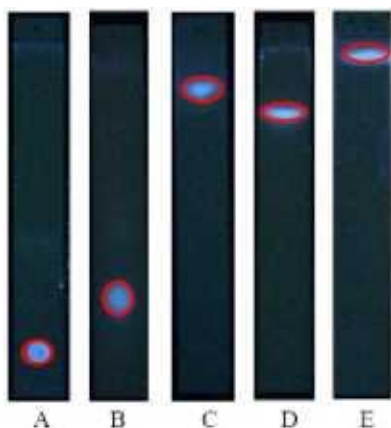
Fraksi	Jumlah Vial	Wujud dan Warna Fraksi	Jumlah Noda
A	1-14	Minyak (Bening)	2
B	15-19	Minyak (Kuning)	3
C	20-31	Minyak (Kuning Pekat)	5
D	32-37	Minyak (Kuning Pekat)	3
E	38-46	Minyak (Kuning)	3
F	47-61	Minyak (Kuning)	2

Fraksi A, B, C dan D menunjukkan positif flavonoid setelah diberi penampak bercak uap amoniak, namun fraksi C memberikan hasil flavonoid yang lebih dominan dan terlihat jelas dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Fraksi C selanjutnya dipisahkan menggunakan metode KLT preparatif dengan fasa diam plat silika gel 60 F254 ukuran 20 cm x 20 cm, ketebalan 0,5 mm-2,0 mm dan fasa gerak berupa campuran kloroform: metanol (9:1). Hasil KLT preparatif fraksi C ditampilkan pada gambar 3.



Gambar 3. Profil KLT preparatif fraksi C dengan fasa gerak kloroform: metanol (9:1) (A: pada UV X 254 nm ; B: pada UV X 365 nm)

Pita C3 selanjutnya dikerok, dilarutkan, dan disaring hingga didapat isolat flavonoid C3. Isolat flavonoid C3 diuji kemurniannya dengan berbagai eluen tunggal dan campuran seperti yang disajikan pada gambar 4.

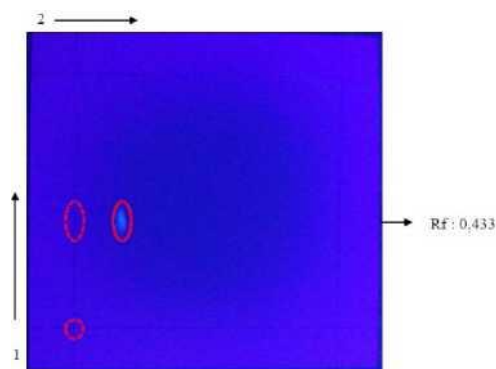


Keterangan: Fasa gerak (A) = kloroform, Fasa gerak (B) = etil asetat, Fasa gerak (C) = metanol, Fasa gerak

(D) = kloroform: metanol (9:1), Fasa gerak (E) = kloroform: Methanol (1:1)

Gambar 4. Profil KLT uji kemurnian isolat flavonoid C3 dengan berbagai fasa gerak pada UV X 365 nm

Uji kemurnian dilanjutkan menggunakan metode KLT dua dimensi seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Profil KLT dua dimensi pada uji kemurnian isolat flavonoid C3 dengan berbagai fasa gerak pada UV X 365 nm

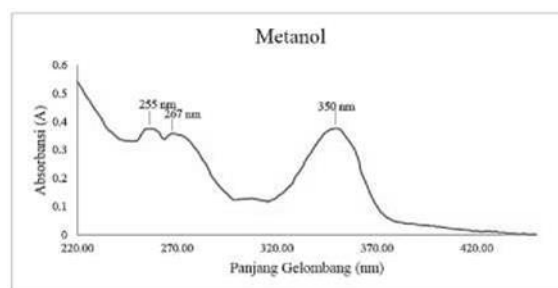
Keterangan:

1. Kloroform: metanol (9:1)
2. Kloroform: metanol (10:1)

Pada gambar 4 dan 5, terlihat hasil KLT menunjukkan noda tunggal. Hal ini diduga bahwa isolat flavonoid C3 telah murni. Noda pada KLT dua dimensi berwarna fluoresensi hijau kebiruan setelah diberi penampak bercak uap amoniak yang diduga isolat flavonoid C3 termasuk ke dalam flavonoid jenis flavon, flavonol atau flavanon, sesuai dengan tabel penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid [7]. Isolat flavonoid C3 diuapkan dan diperoleh isolat flavonoid sebanyak 0,006 gram.

### Identifikasi Struktur Flavonoid

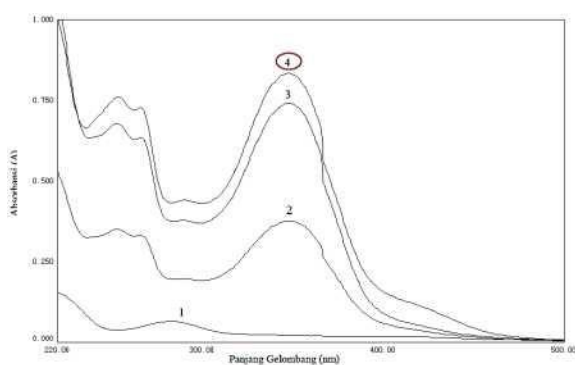
Isolat flavonoid C3 dilarutkan dalam metanol, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperoleh spektrum yang disajikan pada gambar 6.



Gambar 6. Spektrum UV-Vis isolat flavonoid C3 dalam metanol

Isolat flavonoid C3 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan tiga serapan panjang gelombang, yaitu pita I (350 nm) dan pita II (255 nm dan 267 nm). Pita I pada flavonoid

menunjukkan absorpsi pada cincin B sinamoil dan pita II adalah absorpsi cincin A benzoil. Menurut [7] dilihat dari spektrum yang diperoleh diduga isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa flavon, karena flavon memiliki rentang serapan pita I (310–350 nm) dan pita II (255–280 nm). Hal ini sesuai dengan hasil identifikasi awal menggunakan KLT dengan diberi uap amoniak. Menurut penelitian [1], jenis flavonoid yang terdapat pada daun johar (*Senna siamea* L.,) adalah luteolin, yang merupakan salah satu senyawa yang termasuk golongan flavon. Peneliti lain [8] telah melakukan penelitian mengenai luteolin yang juga dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Luteolin memiliki panjang gelombang pada pita I (348 nm) dan pita II (254 dan 266 nm). Spektrum isolat flavonoid C3 dibandingkan dengan spektrum senyawa luteolin menurut penelitian [8] yang dapat dilihat pada gambar 7 (spektrum UV-Vis nomor 4).



Gambar 7. Spektrum UV-Vis fosfolipid (1), campuran fisik luteolin dan fosfolipid (2), kompleks luteolin-fosfolipid (3), dan luteolin (4)[8]

Isolat flavonoid C3 memiliki kemiripan pola spektrum dan serapan panjang gelombang pada pita I dan pita II dengan senyawa luteolin hasil penelitian [8]. Oleh sebab itu dapat diduga bahwa isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa luteolin.

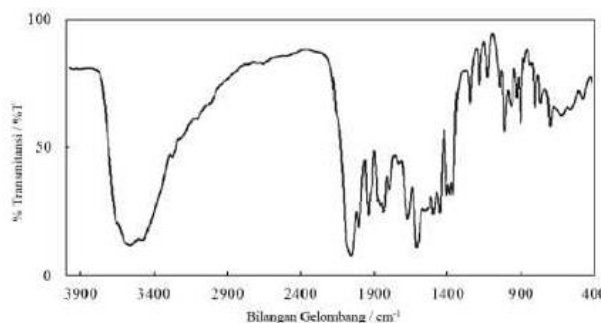
Isolat flavonoid C3 diidentifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah untuk menunjukkan gugus fungsi yang terdapat pada isolat. Spektrum inframerah dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Spektrum Spektrum FTIR isolate flavonoid C3

Dari hasil analisis isolat flavonoid C3 memiliki pita serapan pada bilangan gelombang 3436,19  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya vibrasi ulur O-H yang dapat membentuk ikatan hidrogen. Pita serapan pada 2926,95  $\text{cm}^{-1}$  dan 2858,88  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya

vibrasi ulur C-H alifatik. Pita serapan pada bilangan gelombang 1737,71  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O dan pita serapan pada bilangan gelombang 1628,70  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi ulur C=C aromatik. Pita serapan pada bilangan gelombang 1166,00  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur C-O eter (jembatan O), pita serapan pada bilangan gelombang 1047,31  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur C-O alkohol dan pita serapan pada bilangan gelombang 849,88  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi tekuk C-H keluar bidang yang menandakan adanya substitusi cincin aromatic [9]. Spektrum FTIR isolat flavonoid C3 dibandingkan dengan spektrum FTIR luteolin standar yang dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Spektrum FTIR luteolin standar

Spektrum FTIR luteolin standar menunjukkan adanya pita serapan pada 4307  $\text{cm}^{-1}$ , 1656  $\text{cm}^{-1}$ , 1610  $\text{cm}^{-1}$ , 1134  $\text{cm}^{-1}$ , dan 820  $\text{cm}^{-1}$ . Pita serapan pada 4307  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus O-H pada benzena, pita serapan pada 1656  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C=O, pita serapan pada 1610  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C=C aromatik, pita serapan pada 1134  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-O eter, pita serapan pada 1025  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-O alkohol dan pita serapan pada 820  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H keluar bidang yang menandakan adanya substitusi cincin aromatik. Perbandingan bilangan gelombang dan gugus fungsi isolate flavonoid C3 dengan gugus fungsi luteolin standar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan bilangan gelombang dan gugus fungsi isolat flavonoid C3 dengan gugus fungsi luteolin standar

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang Isolat Flavonoid C3 ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bilangan Gelombang Luteolin Standar ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H ulur	3436,19	4307
-C-H ulur alifatik	2926,95, 2858,88	-
C=O ulur	1737,71	1656
C=C aroinatik	1628,70	1610
C-O eter (jembatan O)	1166,00	1134
C-O alkohol	1047,31	1025
C-H tekuk keluar bidang (substitusi benzena)	849,88	820

Hasil perbandingan antara spektrum FTIR isolat flavonoid C3 dengan spektrum FTIR luteolin standar

menunjukkan adanya satu perbedaan puncak serapan diantara keduanya. Pada spektrum FTIR isolat flavonoid C3 menunjukkan adanya pita serapan pada 2926,95 dan 2858,88  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan keberadaan gugus C-H alifatik, sedangkan pada spektrum FTIR luteolin standar tidak menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang tersebut. Dengan keberadaan gugus C-H alifatik tersebut diduga isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi, akan tetapi posisi gugus O-H yang tersubstitusi tidak dapat diketahui sehingga struktur lengkap dari isolat flavonoid C3 belum dapat diajukan.

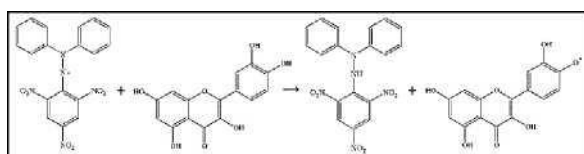
**Uji Aktivitas Antioksidan**

Hasil aktivitas antioksidan isolat flavonoid C3 yang dilakukan menggunakan KLT dengan fasa gerak campuran kloroform: metanol (9:1) menunjukkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning pada noda yang ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 10. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid C3 pada sinar tampak

Penentuan aktivitas antioksidan dilanjutkan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) terhadap isolat flavonoid C3 dan kuersetin sebagai pembanding. Flavonoid akan menghambat aktivitas radikal bebas dari DPPH karena memiliki kemampuan untuk mendonorkan radikal protonnya yang akan menyebabkan terjadinya reduksi membentuk DPPH nonradikal. Reaksi peredaman radikal bebas oleh flavonoid yang mungkin terjadi dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Reaksi peredaman radikal bebas oleh flavonoid [10]

Parameter uji aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration (IC50)* yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan sebesar 50%. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  isolat flavonoid C3 dan kuersetin

Sampel	$IC_{50}$ (mg/L)
Isolat Flavonoid C3	139.8373

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa isolat flavonoid C3 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah dari kuersetin. Harga  $IC_{50}$  yang baik yaitu di bawah 200 mg/L [11], oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa isolat flavonoid C3 memiliki aktivitas antioksidan. Tingginya aktivitas antioksidan pada kuersetin disebabkan kuersetin yang digunakan merupakan senyawa murni yang mempunyai kemampuan lebih besar untuk mendonorkan protonnya. Gugus hidroksil sangat berperan dalam meredam radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya.

**4. Kesimpulan**

Isolat flavonoid dari ekstrak etanol daun johar (*Senna siamea* Lamk) diperoleh sebesar 0,006 gram (0,004 %). Identifikasi isolat flavonoid daun johar menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR menunjukkan bahwa isolat tersebut diduga memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi. Isolat flavonoid daun johar memiliki aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh harga  $IC_{50}$  sebesar 139,8373 mg/L.

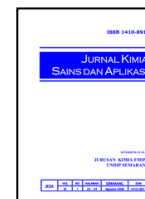
**5. Daftar Pustaka**

- [1] Mamadou Kamagaté, Camille Koffi, N'goran Mathieu Kouamé, Aminata Akoubet, N'guessan Alain Roland Yao, Henri Maxime Die-Kakou, Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of *Cassia siamea* Lam, *The Journal of Phytopharmacology*, 3, 1, (2014) 57-76
- [2] Lakshmi Narayana Majji, Ganga Rao Battu, Ravi Kumar Jangiti, Mallikarjun Rao Talluri, Evaluation of In-Vitro Antibacterial Activity of *Cassia Siamea* leaves, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 3, (2013) 263-265
- [3] P. Poovendran, N. Ramanathan, N. Prabhu, Evaluation of the Antibacterial Activity of *Aegle marmelos* and *Cassia siamea* Extracts Against Biofilm and Extended Spectrum-Lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli*, *International Journal of Microbiological Research*, 5, 3, (2014) 217-221 <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.3.9138>
- [4] S. Kumar, V. Kumar, Om Prakash, Antidiabetic and anti-lipemic effects of *Cassia siamea* leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 11, (2010) 871-873 [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60209-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60209-X)
- [5] Usha Veerachari, A. K. Bopaiah, Preliminary phytochemical evaluation of the leaf extract of five *Cassia* Species, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 5, (2011) 574-583
- [6] K. Ingkaninan, A. P. Ijzerman, R. Verpoorte, Luteolin, a Compound with Adenosine A1 Receptor-Binding Activity, and Chromone and Dihydronaphthalenone Constituents from *Senna siamea*, *Journal of Natural Products*, 63, 3, (2000) 315-317 <http://dx.doi.org/10.1021/np9904152>
- [7] K. R. Markham, *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, 1982.



- [8] Keyong Xu, Benguo Liu, Yuxiang Ma, Jiquan Du, Guanglei Li, Han Gao, Yuan Zhang, Zhengxiang Ning, Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Luteolin-Phospholipid Complex, *Molecules*, 14, 9, (2009) 3486
- [9] Robert Milton Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, 2005.
- [10] Amic Dragan, Davidovic-Amic Dusanka, Beslo Drago, Rastija Vesna, Lucic Bono, Trinajstic Nenad, SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids, *Current Medicinal Chemistry*, 14, 7, (2007) 827-845  
<http://dx.doi.org/10.2174/092986707780090954>
- [11] Marsden S. Blois, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181, (1958) 1199 <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>





## Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram

Moh. Mulyadi<sup>a</sup>, Wuryanti<sup>a</sup>, Purbowatiningrum Ria Sarjono<sup>a\*</sup>

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

\* Corresponding author: [purbowatining@live.undip.ac.id](mailto:purbowatining@live.undip.ac.id)

### Article Info

Keywords:  
 Minimum  
 Inhibitory  
 Concentration  
 (MIC),  
 Antibacterial, Reeds

### Abstract

Bacteria are microorganisms around us. Recent study was sought an alternative source that serves as an antibacterial because some pathogenic bacteria to be resistant with antibacterial. Materials are reported to have antibacterial activity among the reeds. Reed efficacious drug for acute kidney inflammation, antibacterial, vomiting blood, gonorrhoea, and nosebleeds. This study aimed to obtain the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the sample degree as an antibacterial reeds and obtain the data most potent antibacterial activity of the sample degree against the reeds to *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. One of the methods method used is the performance test antibacterial paper disk diffusion method. This method is done by placing a paper disc that had been soaked in the test solution on solid media has been inoculated with the bacteria test. Once inoculated, the bacterial growth was observed to see the clear zone around the disc. Zone inhibition that is formed around the discs at the lowest concentration of antibacterial is the MIC. MIC from the sample degree of the reeds against *Escherichia coli* bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* in a row of leaf sample degree in ethanol by 7%, 7%, 8% and 9%, for the sample degree flowers in ethanol of interest at 7%, 7%, 9% and 7%, and for the sample degree roots in ethanol of 7%, 8%, 10% and 8%. The third sample degree of reeds showed a good potential to inhibit bacteria *Escherichia coli*. The sample degree of leaves and flowers are more potential than roots of reeds to inhibit *Pseudomonas aeruginosa*. On the other hand, the most potential for inhibition *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* are sample degree of reeds leaves and flowers, respectively.

### Abstrak

Kata kunci:  
 Konsentrasi Hambat  
 Minimum (KHM),  
 Antibakteri, Alang-  
 alang

Bakteri merupakan mikroorganisme yang berada di sekitar kita. Penelitian yang sering dilakukan untuk mencari sumber alternatif lain yang berfungsi sebagai antibakteri karena adanya beberapa bakteri yang menjadi resisten terhadap suatu antibakteri. Bahan-bahan yang dilaporkan memiliki aktifitas antibakteri diantaranya adalah alang-alang. Alang-alang berkhasiat untuk obat radang ginjal akut, antibakteri, muntah darah, kencing nanah dan mimisan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kadar sampel alang-alang sebagai antibakteri serta memperoleh data aktifitas antibakteri yang paling potensial kadar sampel alang-alang terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*. Salah satu metode yang digunakan dalam uji antibakteri yaitu metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Pertumbuhan bakteri diamati setelah diinokulasi untuk melihat zona bening disekitar

cakram. Zona bening yang terbentuk di sekitar cakram pada konsentrasi antibakteri terendah merupakan nilai KHM. KHM kadar sampel alang-alang terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* berturut-turut dari kadar sampel daun dalam etanol sebesar 7%, 7%, 8% dan 9%; untuk kadar sampel bunga dalam etanol sebesar 7%, 7%, 9% dan 7%; dan untuk kadar sampel akar dalam etanol 7%, 8%, 10% dan 8%. Ketiga kadar sampel alang-alang cukup potensial untuk menghambat bakteri *Escherichia coli*. Kadar sampel daun dan bunga lebih potensial dibandingkan akar alang-alang untuk menghambat *Pseudomonas aeruginosa*. Kadar sampel yang paling potensial untuk menghambat *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* berturut-turut adalah kadar sampel daun dan kadar sampel bunga alang-alang.

## 1. Pendahuluan

Alang-alang tumbuh liar di hutan, ladang, lapangan rumput dan tepi jalan pada daerah kering yang mendapat sinar matahari. Tanaman yang mudah menjadi banyak ini bisa ditemukan pada ketinggian 1-2700 m di atas permukaan laut [1]. Garrity dkk. [2] melaporkan luas padang alang-alang di Indonesia mencapai 8,5 juta hektar atau sekitar 4,47% dari luas wilayah Indonesia. Alang-alang bukan hanya sebagai pesaing bagi tanaman lain terutama tanaman pangan dalam mendapatkan air, unsur hara dan cahaya tetapi juga menyebabkan pengaruh negatif pada tanaman lain [3]. Dibalik dampak negatif dari alang-alang yang telah di sebutkan di atas ternyata alang-alang berkhasiat untuk obat radang ginjal akut, muntah darah, kencing nanah dan mimisan. Menurut Koh dkk. [4] khasiat farmakologi alang-alang sebagai antidiuretik, anti inflamasi, neuroprotektif dan antibakteri.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menyelidiki manfaat dari alang-alang. Sripanidkulchai dkk. [5] melaporkan antibakteri dari ekstrak air alang-alang (*Imperata cylindrica*) dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* sebesar 62,5 mg/mL dan *Klebsiella sp.* dengan KHM >125.0 mg/mL. Alang-alang yang digunakan merupakan alang-alang dari Thailand dengan bagian yang digunakan berupa rimpang (rizoma) alang-alang. Khaerunnisa (2009) melaporkan adanya senyawa bioaktif dari akar alang-alang (*Imperata cylindrica*) yang dimanfaatkan sebagai antioksidan. Telah dilakukan oleh Mak-Mensah (2010) uji antihipertensi dari ekstrak etanol daun *Imperata cylindrica* pada hewan. Hasil yang diperoleh pada konsentrasi 160 dan 320 mg/mL mampu menurunkan tekanan hati dari 266 menjadi 180 mmHg dengan dosis efektif  $EC_{50} = 0,013$ . Adanya beberapa bakteri patogen yang menjadi resistan terhadap antibakteri yang sudah ada dipasaran sehingga dianggap perlu adanya antibakteri alternatif, karena itu pada penelitian ini akan dilakukan uji antibakteri menggunakan ekstrak etanol daun, bunga dan akar alang-alang. Bakteri patogen yang akan digunakan terhadap ekstrak alang-alang adalah *Escherichia coli* dan *Pseudomonas* yang merupakan bakteri gram negatif serta bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* merupakan bakteri gram positif. Bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare sedangkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi pada luka bakar.

Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi pada kulit. Bakteri *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan makanan menjadi busuk dan bersifat racun jika dikonsumsi.

Sampel yang digunakan berupa akar, daun dan bunga alang-alang dari belakang laboratorium obat Universitas Diponegoro Tembalang Semarang. Pemilihan sampel dimaksudkan untuk membandingkan aktivitas antibakteri tiap bagian alang-alang. Sampel tersebut digunakan dalam kondisi kering. Tahap selanjutnya dilakukan maserasi menggunakan etanol untuk memperoleh ekstrak sampel. Pada proses maserasi sekaligus pembuatan variasi konsentrasi dengan perbandingan sampel dan etanol (w/w). Masing-masing variasi konsentrasi dilakukan uji terhadap bakteri uji. Zona bening yang terbentuk pada media yang telah diinokulasi bakteri disekitar cakram kertas yang di celupkan sampel menunjukkan aktivitas penghambatan dari sampel terhadap bakteri uji. Pencelupan cakram kertas ke dalam larutan sampel sampai merata di seluruh permukaan cakram kertas. Konsentrasi terendah dari sampel uji yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji merupakan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kadar sampel alang-alang sebagai antibakteri serta memperoleh data aktifitas antibakteri yang paling potensial kadar sampel alang-alang terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*.

## 2. Metode Kerja

### Bahan dan Alat

Kadar sampel etanol alang-alang meliputi daun, bunga dan akar, Bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*, Etanol, Akuades, Ekstrak ragi, Pepton, NaCl, dan bubuk agar. Inkubator (memert), neraca analitik (Kern 870), penggaris, shaker, oven, autoklaf clinic (prestide medical series 2100), lemari pendingin, cawan petri, mikropipet (ependorf), erlenmeyer, tabung reaksi, jarum ose, botol semprot dan lampu bunsen.

### Pembuatan Larutan Ekstrak Sampel

Sampel yang digunakan berupa alang-alang yang meliputi daun, bunga dan akar. Masing-masing bagian alang-alang sebagai sampel dilakukan pengeringan

selama satu minggu kemudian dilakukan pembレンダーan. Maserasi selama tiga hari menggunakan etanol 70% dengan perbandingan sampel dan etanol (w/w) sehingga langsung diperoleh beberapa konsentrasi (w/w). Untuk memisahkan ekstrak dan sampel dilakukan penyaringan. Kadar sampel alang-alang yang dibuat mulai dari 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20% dan 30%. Ekstrak yang diperoleh kemudian sebagai bahan antibakteri sampel yang akan di uji.

#### Pensterilan Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dilakukan pencucian hingga bersih dan dilanjutkan pengeringan. Langkah selanjutnya dilakukan pensterilan menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan temperatur sebesar 121°C dengan tekanan 2 atm, begitu juga media yang digunakan yang berupa media *Nutrient broth* dan *Nutrient agar*.

#### Pembuatan Media

Untuk *Nutrient broth* dibuat dari campuran 0,5 g ekstrak ragi, 0,25 g pepton dan 0,25 g NaCl yang dilarutkan dalam 50 mL akuades pada erlenmeyer. Untuk *Nutrient agar* dibuat dari campuran 0,5 g ekstrak ragi, 0,75 g pepton, 0,25 g NaCl dan 1,5 g agar yang dilarutkan dalam akuades 150 mL pada Erlenmeyer (kurang lebih untuk 6 buah cawan petri berukuran diameter ±10 cm). Media yang akan digunakan didinginkan terlebih dahulu sebelum digunakan.

#### Regenerasi Bakteri

Mengambil bakteri satu mata ose dari stok bakteri yang akan digunakan. Kemudian dilakukan inokulasi dalam media *Nutrient broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Menyiapkan 2 buah media *Nutrient broth* (NB) dengan 1 media sebagai kontrol negatif (tanpa diinokulasi bakteri) sebagai pembanding terjadinya pertumbuhan bakteri pada media yang telah diinokulasi. Perlakuan diulang 3 kali untuk regenerasi pertama yang selanjutnya digunakan untuk uji.

#### Pengujian Antibakteri

Cakram dicelupkan ke dalam larutan sampel sampai merata di seluruh permukaan cakram dengan berbagai macam konsentrasi yang telah disiapkan. Penuangan media *nutrient agar* (NA) yang telah disterilkan ke dalam petridish. Media *nutrient agar* (NA) yang telah dingin dan memadat selanjutnya di tanami bakteri. Bakteri yang di tanam diratakan hingga seluruh permukaan *nutrient agar* (NA) dengan menggunakan *spreader*. Kemudian cakram tersebut diletakkan dalam media *nutrient agar* (NA) yang telah ditanami bakteri. Langkah selanjutnya dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktifitas antibakteri terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari konsentrasi tersebut. Konsentrasi terkecil dari sampel yang mampu menghambat bakteri yang diinokulasikan dengan terbentuknya zona bening merupakan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari sampel tersebut.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa tahapan yaitu regenerasi bakteri, pembuatan kadar sampel etanol daun, bunga dan akar alang-alang serta pengujian antibakteri kadar sampel etanol alang-alang. Sampel alang-alang di ambil dari belakang Laboratorium Obat Universitas Diponegoro.

#### Regenerasi Bakteri

Bakteri yang akan digunakan dilakukan regenerasi untuk *refresh* bakteri sehingga bakteri dapat beradaptasi pada media yang baru (diperoleh sel bakteri yang muda). Pembuatan *Nutrient broth* (NB) digunakan sebagai media pembiakan bakteri. NB yang dibuat terdiri dari ekstrak ragi yang digunakan sebagai sumber protein, pepton sebagai sumber nitrogen dan NaCl sebagai sumber garam-garam mineral. Penambahan akuades berfungsi untuk melarutkan ragi, pepton dan NaCl. Tahap selanjutnya setelah NB dingin, dilakukan penanaman bakteri dan kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam dengan suhu 37°C *Shaker incubator* berfungsi untuk mengalirkan udara yang berada dalam erlenmeyer sehingga adanya sirkulasi oksigen yang lebih baik untuk pertumbuhan bakteri. Tujuan inkubasi itu sendiri yaitu untuk mengkondisikan lingkungan pada suhu optimum perkembangan bakteri sehingga dapat diketahui bahwa bakteri berkembang dengan baik. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam, pada media NB kontrol terlihat jernih yang menunjukkan bahwa tidak terjadi pertumbuhan bakteri dalam *nutrient broth* tersebut, sedangkan pada media NB yang diinokulasi bakteri terlihat keruh yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam *nutrient broth* tersebut.

#### Pembuatan Kadar Sampel Alang-alang dalam Etanol

Sampel yang digunakan berupa daun, bunga dan akar alang-alang. Pengambilan kadar sampel dilakukan dengan perendaman masing-masing sampel yang sudah kering dalam etanol [6]. Penggunaan etanol dimaksudkan untuk melarutkan senyawa polar yang terkandung dalam alang-alang. Sripanidkulchai *dkk.* [5] melaporkan adanya senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam sampel, sehingga senyawa yang terjebak lebih murni. Pembレンダーan juga dilakukan untuk menghancurkan dinding sel dari sampel sehingga pada waktu perendaman, senyawa dalam sampel lebih meresap dalam etanol. Penyaringan untuk memperoleh larutan ekstrak alang-alang. Pembuatan kadar sampel tersebut dilakukan saat perendaman 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20% dan 30% (w/w) terhadap etanol.

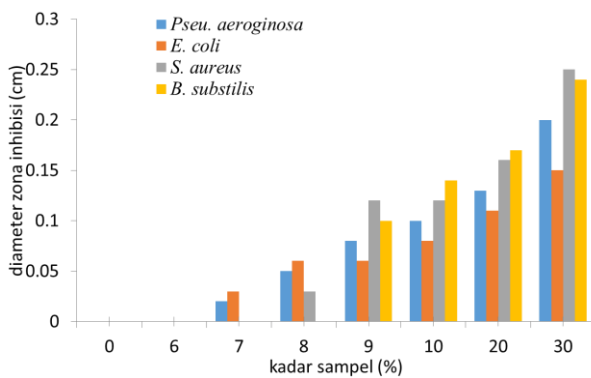
#### Pengujian Antibakteri Kadar Sampel Alang-alang dalam Etanol

Bakteri yang akan digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri gram negatif serta bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* merupakan bakteri gram positif. Alasan penggunaan bakteri ini sebagai pembanding, karena bakteri secara garis besar dikelompokkan berdasarkan

susunan dinding selnya menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan gram negatif [7].

Metode yang digunakan dalam uji antibakteri ini yaitu metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang di uji. Kertas cakram yang digunakan berdiameter 0,5 cm.

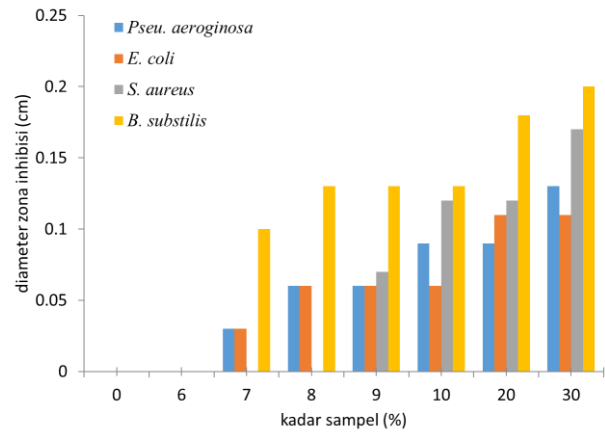
Hasil pengamatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan kadar sampel daun alang-alang dalam etanol dapat diplotkan dalam Gambar 1



Gambar 1. Hasil Uji Antibakteri Kadar Sampel Daun Alang-alang dalam Etanol

Pada Gambar 1 terlihat bahwa kadar sampel etanol daun alang-alang mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi terkecil 7% diameter sebesar 0,02 cm, *E. coli* pada konsentrasi 7% diameter sebesar 0,03 cm, *S. aureus* pada konsentrasi 8% diameter sebesar 0,03 cm dan *B. subtilis* pada konsentrasi 9% diameter sebesar 0,1 cm. Pada Gambar 1 terlihat bahwa terjadinya kenaikan konsentrasi dari 7% sampai 30% kadar sampel daun alang-alang dalam etanol maka terjadi pula kenaikan daya hambat dari kadar sampel daun alang-alang dalam etanol untuk keempat bakteri tersebut. Meskipun untuk bakteri *B. subtilis* pada konsentrasi 10% terjadi penurunan daya hambat dibandingkan konsentrasi 9%, namun pada konsentrasi 20% dan 30% terjadi kenaikan daya hambat.

Hasil pengamatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan kadar sampel bunga alang-alang dalam etanol dapat diplotkan dalam Gambar 2.

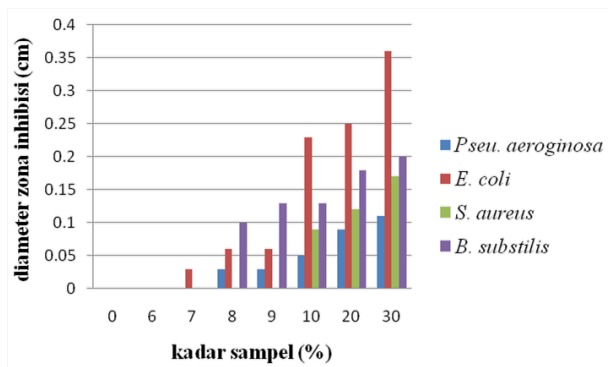


Gambar 2. Hasil Uji Antibakteri Kadar Sampel Bunga Alang-alang dalam Etanol

Pada Gambar 2 terlihat bahwa kadar sampel bunga alang-alang dalam etanol mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi terkecil konsentrasi 7% diameter sebesar 0,03 cm, *E. coli* pada konsentrasi 7% diameter sebesar 0,03 cm,

*S. aureus* pada konsentrasi 9% diameter sebesar 0,07 cm dan *B. subtilis* pada konsentrasi 8% diameter sebesar 0,13 cm. Pada Gambar 2 terlihat bahwa terjadinya kenaikan konsentrasi dari 7% sampai 30% kadar sampel bunga alang-alang dalam etanol maka terjadi pula kenaikan daya hambat dari kadar sampel bunga alang-alang dalam etanol untuk keempat bakteri tersebut. Meskipun untuk bakteri *B. Subtilis* dan *E. coli* pada konsentrasi 8%, 9% dan 10% memiliki daya hambat yang sama namun pada konsentrasi 20% dan 30% terjadi kenaikan daya hambat.

Hasil pengamatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan kadar sampel akar alang-alang dalam etanol dapat diplotkan dalam Gambar 3



Gambar 3. Hasil Uji Antibakteri Kadar Sampel Akar Alang-alang dalam Etanol

Pada Gambar 3 terlihat bahwa kadar sampel daun alang-alang dalam etanol mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi terkecil 8% diameter sebesar 0,03 cm, *E. coli* pada konsentrasi 7% diameter sebesar 0,03 cm, *S. aureus* pada konsentrasi 10% diameter sebesar 0,09 cm dan *B. subtilis* pada konsentrasi 9% diameter sebesar 0,13 cm. Pada Gambar 3 terlihat bahwa terjadinya kenaikan



konsentrasi dari 7% sampai 30% kadar sampel akar alang-alang dalam etanol maka terjadi pula kenaikan daya hambat dari kadar sampel akar dalam etanol alang-alang untuk keempat bakteri tersebut. Meskipun untuk bakteri *B. subtilis* pada konsentrasi 9% dan 10% memiliki daya hambat yang sama namun pada konsentrasi 20% dan 30% terjadi kenaikan daya hambat. Begitu juga untuk bakteri *E. coli* pada konsentrasi 8% dan 9% memiliki daya hambat yang sama namun pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% terjadi kenaikan daya hambat.

Hasil kadar sampel daun, bunga dan akar dalam etanol menunjukkan bahwa bakteri gram positif lebih sukar dihambat daripada bakteri gram negatif. Hal ini dikarenakan dinding sel bakteri gram positif jauh lebih tebal dibandingkan bakteri gram negatif. Pada bakteri gram positif, kandungan peptidoglikan dinding selnya lebih banyak daripada lipid dan sebaliknya pada bakteri gram negatif, pada dinding selnya kandungan lipid lebih banyak daripada peptidoglikan. Menurut [8], bakteri gram negatif memperlihatkan tiga lapis pembungkus sel yaitu membran bagian luar (OM/outer membran), lapisan tengah yang merupakan dinding sel atau lapisan murein dan membran plasma dalam.

Mekanisme penghambatan bakteri belum dapat diprediksikan karena kandungan senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri belum diketahui secara pasti perlu pemurnian dan identifikasi lebih lanjut. Umumnya suatu agen antibakteri berpengaruh terhadap sel bisa melalui penghambatan dinding sel, penghambatan fungsi membran, penghambatan sintesis protein dan asam nukleat, perubahan molekul protein dan asam nukleat serta penghambatan enzim [7]. Bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan pada dinding sel yang tipis dan dikelilingi lipoprotein, lipopolisakarida, fosfolipid dan beberapa protein. Jika diuraikan lipopolisakarida mempunyai struktur lipid dan polisakarida. Pada bakteri gram positif dinding sel tersusun atas jaringan dengan pori yang banyak dan lapisan peptidoglikan yang tebal serta dikelilingi lapisan asam ketoat.

Data yang diperoleh, bakteri gram negatif lebih dapat bertahan terhadap ekstrak etanol alang-alang daripada bakteri gram positif. Ketika kadar sampel alang-alang dalam etanol ini bekerja pada bakteri gram positif, kadar sampel akan berikatan dengan peptidoglikan sehingga mampu merusak dinding sel dan pertumbuhan bakteri gram positif dapat dihambat. Berlaku prinsip like dissolved like, mengingat kadar sampel alang-alang dalam etanol yang bersifat polar begitu juga dengan peptidoglikan yang terdiri dari protein dan karbohidrat yang bersifat polar juga. Prinsip like dissolved like yaitu suatu senyawa polar akan larut dengan senyawa polar, sebaliknya senyawa nonpolar akan larut dalam senyawa nonpolar. Berbeda dengan bakteri gram negatif. Ketika kadar sampel alang-alang dalam etanol bekerja, tidak dapat langsung berikatan dengan peptidoglikan namun harus merusak outer membran lebih dahulu. Ini yang menyebabkan bakteri gram negatif lebih sukar dihambat dibandingkan bakteri gram positif. Kadar sampel etanol alang-alang lebih

efektif dalam menghambat bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif.

Menurut Pratama [9], respon hambatan pertumbuhan bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut

Tabel 1 : Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri

Diameter zona bening	Respon hambatan pertumbuhan
>20 mm	Kuat
16-20 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
<10 mm	Kurang efektif

Menurut Tabel 1 tentang klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri, sampel alang-alang yang berupa kadar sampel bunga, daun dan akar dalam etanol memiliki respon hambatan pertumbuhan antibakteri yang kurang efektif. Hal ini dikarenakan senyawa yang terlarut dalam etanol berupa campuran beberapa senyawa yang tidak kesemuanya memiliki sifat menghambat bakteri sehingga cenderung memiliki daya hambat yang kecil.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar sampel alang-alang dalam etanol mampu digunakan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*.

#### 4. Kesimpulan

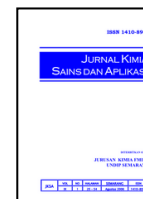
KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) kadar sampel alang-alang dalam etanol terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* berturut-turut dari kadar sampel daun dalam etanol sebesar 7%, 7%, 8% dan 9%; untuk kadar sampel bunga dalam etanol sebesar 7%, 7%, 9% dan 7%; dan untuk kadar sampel akar dalam etanol 7%, 8%, 10% dan 8%. Hasil penelitian menunjukkan kadar sampel alang-alang dalam etanol yang paling potensial pada inhibisi bakteri *Escherichia coli* adalah kadar sampel alang-alang, pada inhibisi *Pseudomonas aeruginosa* yang paling potensial adalah kadar sampel daun dan bunga, pada inhibisi *Bacillus subtilis* yang paling potensial adalah kadar sampel daun dan pada inhibisi *Staphylococcus aureus* yang paling potensial adalah kadar sampel bunga.

#### 5. Daftar Pustaka

- [1] Setiawan Dalimartha, Atlas tumbuhan obat Indonesia, Trubus Agriwijaya, 1999.
- [2] D. P. Garrity, M. Soekardi, M. van Noordwijk, R. de la Cruz, P. S. Pathak, H. P. M. Gunasena, N. van So, G. Huijun, N. M. Majid, The Imperata grasslands of tropical Asia: area, distribution, and typology, *Agroforestry Systems*, 36, 1, (1996) 3-29 10.1007/BF00142865
- [3] Kurniatun Hairiah, Meine van Noordwijk, Pratiknyo Purnomosidhi, Reclamation of Imperata Grassland



- using Agroforestry, in, International Centre for Research in Agroforestry, Bogor, 2000.
- [4] Hwee Ling Koh, Tung Kian Chua, Chay Hoon Tan, A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach, World Scientific, 2012.
- [5] Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tattawasart, Pisamai Laupattarakasem, Varima Wongpanich, Anti-inflammatory and Bactericidal Properties of Selected Indigenous Medicinal Plants Used for Dysuria, *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 26, 1-2, (2002) 33-38
- [6] EE Mak-Mensah, EO Terlabi, G Komlaga, Antihypertensive action of ethanolic extract of *Imperata cylindrica* leaves in animal models, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 14, (2013) 1486-1491
- [7] Michael J. Pelczar, E. C. S. Chan, Dasar-dasar mikrobiologi, R.S. Hadjoetomo, Universitas Indonesia Press, Jakarta, 1988.
- [8] M. R. J. Salton, K. S. Kim, Structure, in: S. Baron (Ed.) *Medical Microbiology*, University of Texas Medical, Galveston, 1996.
- [9] Moch Rachdie Pratama, Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar, Program Studi Biologi, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya



## Sintesis Turunan *Azomethin* Sebagai Zat Aktif Inhibitor Korosi pada Logam Menggunakan Bahan Dasar Piperonal dan 2-Aminopiridin

Intan Endah Rachmawati<sup>a</sup>, Ngadiwiyana<sup>a\*</sup>, Ismiyanto<sup>a</sup>

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

\* Corresponding author: [ngadiwiyana@live.undip.ac.id](mailto:ngadiwiyana@live.undip.ac.id)

Article Info	Abstract
<p>Keywords:            azomethin,            corrosion            inhibition, weight            loss, corrosion rate</p>	<p>Derivative compound synthesis from azomethin had been done through condensation reaction of piperonal and 2-aminopyridine by varying toluene, benzene, etanol solution for 3 hours. The result was characterized melting point and identified with UV-Vis spectroscopy, FTIR, and LC-MS. Corrosion inhibition activity test was done on iron by using weight loss method. Identification of UV-Vis spectra was observed a peak at 233 nm and FTIR proved azomethin group (C=N) wavenumber on 1604.77 cm<sup>-1</sup>, LC-MS showed molecule weight 226.26 gram/mol identical N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine. Corrosion rate of 1% concentrated from derivative compound from azomethin was 1.2 mg cm<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> with 4 hour submerging time.</p>
<p>Kata kunci:            azomethin, inhibitor            korosi, weight loss,            laju korosi</p>	<p><b>Abstrak</b></p> <p>Sintesis senyawa turunan <i>azomethin</i> dilakukan melalui reaksi kondensasi antara piperonal dan 2-aminopiridin dengan variasi pelarut toluen, benzen, etanol selama 3 jam. Karakterisasi produk sintesis melalui uji titik leleh dan diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis, FTIR dan LC-MS. Dilakukan pengujian antikorosi pada logam besi untuk mengetahui aktivitas inhibitor korosi menggunakan metode <i>weight loss</i>. Identifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis muncul pada serapan 233 nm dan pada FTIR pada bilangan gelombang 1604,77 cm<sup>-1</sup> yang merupakan gugus C=N, serta menggunakan LC-MS diketahui bahwa senyawa mempunyai berat molekul 226,26 gram/mol identik senyawa N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine. Laju korosi senyawa turunan <i>azomethin</i> pada konsentrasi 1% sebesar 1,2 mg cm<sup>-2</sup> hari<sup>-1</sup> dengan perendaman selama 4 jam.</p>

### 1. Pendahuluan

Salah satu kelemahan logam apabila dibiarkan di udara akan terjadi korosi akibat interaksi dengan oksigen. Selain itu, korosi suatu logam dipengaruhi oleh tingkat pencemaran udara, suhu, kelembaban, dan keberadaan zat-zat kimia yang bersifat korosif [1]. Korosi merupakan suatu reaksi redoks antara suatu logam dengan berbagai zat di lingkungannya yang mengakibatkan penurunan mutu logam tersebut. Korosi dapat dicegah dengan mengubah besi menjadi baja tahan karat (*stainless steel*), pelapisan (*coating*), proteksi

katodik, dan dapat pula dicegah menggunakan senyawa inhibitor korosi [2].

Senyawa inhibitor korosi merupakan suatu zat yang apabila ditambahkan dalam lingkungan yang korosif dapat menurunkan laju korosi. Senyawa inhibitor korosi pada logam jenisnya ada dua, yaitu anorganik dan organik [3]. Fosfat, kromat, dikromat, silikat, borat, tungstat, molibdat dan arsenat adalah beberapa senyawa anorganik yang digunakan sebagai senyawa inhibitor korosi pada logam. Senyawa inhibitor korosi organik adalah senyawa heterosiklik yang mengandung

atom nitrogen, sulfur atau oksigen yang mempunyai pasangan elektron bebas [4]. Senyawa inhibitor korosi yang paling efektif adanya senyawa inhibitor organik [5]. Hal ini disebabkan karena senyawa organik yang mengandung atom N, S, O memiliki pasangan elektron bebas pada sistem rantai aromatik yang dapat berikatan dengan muatan positif logam sehingga terjadi adsorpsi antara permukaan logam dengan inhibitor [6]. Salah satu senyawa inhibitor organik adalah senyawa *azomethin*.

Senyawa *azomethin* merupakan hasil reaksi kondensasi antara aldehid dan amina. Aldehid aromatik dan amina primer akan menghasilkan senyawa *azomethin* yang stabil karena akan menghasilkan produk dengan cincin aromatik dan ikatan rangkap yang terkonjugasi [7]). Hania [8] telah melakukan penelitian dan berhasil mensintesis senyawa *azomethin* menggunakan bahan dasar 2-aminopiridin dan benzaldehid, reaksi ini melalui perefluksan selama dua jam dengan pelarut toluen dan dihasilkan produk dengan rendemen 75,6 % dan titik leleh 92-95 °C. Senyawa *azomethin* merupakan senyawa dengan gugus fungsi -C=N- yang mempunyai potensi sebagai inhibitor korosi [9]. Dilihat dari potensinya sebagai senyawa inhibitor korosi, maka penelitian tentang senyawa turunan *azomethin* perlu dikembangkan. Sehingga dapat mempunyai aktivitas yang lebih stabil

Dalam penelitian ini dilakukan sintesis senyawa turunan *azomethin* dari piperonal dan 2-aminopiridin yang mempunyai aktivitas sebagai zat aktif inhibitor korosi pada logam. Dalam sintesis senyawa turunan *azomethin* ini dilakukan variasi pelarut, yaitu toluen, benzen dan etanol. Sintesis senyawa turunan *azomethin* perlu ditentukan pelarut yang tepat untuk menghasilkan produk sintesis yang optimal, sehingga diperoleh rendemen yang optimal.

## 2. Metodologi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2-Aminopiridin 99 % (Aldrich), piperonal p.a, etanol p.a, toluen p.a, benzen p.a, asam asetat p.a, HCl 2 N, logam besi ukuran panjang 3 cm, lebar 1 cm dan tebal 0,52 mm, aseton. Alat yang digunakan dalam penelitian adalah seperangkat alat refluks yang dilengkapi peralatan gelas, seperangkat alat destilasi fraksinasi penurunan tekanan dilengkapi peralatan gelas, seperangkat alat titik leleh Barnstead International 2555 KERPER BLVD, spektrometer UV-Vis (SHIMADZU), FT-IR (SHIMADZU), LC-MS Hitachi L 6200.

## 3. Prosedur Penelitian

### Sintesis senyawa turunan *azomethin*

Piperonal sebanyak 2,957 g (0,0197 mol) dilarutkan dalam 20 mL toluen. Pelarutan dilakukan dalam labu leher tiga volume 150 mL yang dilengkapi dengan pendingin, pengaduk magnetik dan termometer. Setelah piperonal larut, ditambahkan 1,853 g (0,0197 mol) 2-aminopiridin kemudian direfluks selama 3 jam pada suhu refluks sampai larutan homogen. Campuran

kemudian disaring dan kristal yang terbentuk dikeringkan. Hal yang sama dilakukan dalam pelarut benzen. Pada pelarut etanol dilakukan pemurnian campuran hasil refluks dengan destilasi fraksinasi penurunan tekanan. Kristal yang diperoleh ditimbang dan diukur titik lelehnya. Kemudian dianalisis menggunakan spektrometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS.

### Uji Aktivitas Inhibitor Korosi pada Logam Besi

Pengujian inhibitor korosi senyawa turunan *azomethin* dilakukan berdasarkan metode *weight loss* pada logam besi dalam larutan HCl 2 N. Variabel yang diukur dalam metode ini adalah waktu pencelupan logam besi. Dalam metode ini digunakan logam besi yang belum berkarat. Logam tersebut dibersihkan dengan *emery paper* dan dicuci dengan aseton, kemudian logam dikeringkan dalam temperatur ruang. Kemudian logam besi ditimbang untuk mengetahui berat awal.

Logam besi yang dilapisi dengan larutan inhibitor berupa senyawa turunan *azomethin* selama dua hari dan logam besi tanpa dilapisi inhibitor kemudian dilakukan pencelupan pada larutan HCl 2 N dalam botol fial yang berbeda pada temperatur ruang. Lama pencelupan dalam larutan HCl 2N dilakukan dengan variasi lama waktu pencelupan yaitu selama 4 jam; 6 jam; 1 hari; dan 4 hari. Kemudian logam dikeringkan dan dihitung efisiensi inhibitor dan laju korosi terhadap logam besi.

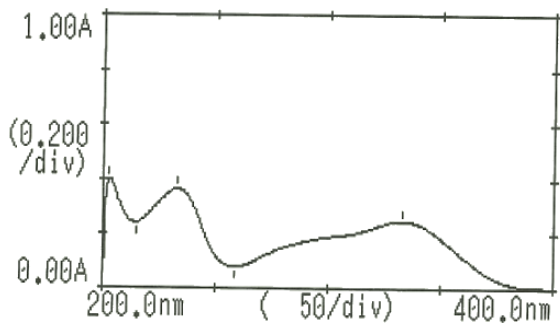
## 4. Hasil dan Pembahasan

### Sintesis Senyawa turunan *azomethin*

Sintesis ini dilakukan dengan variasi pelarut yaitu toluene, benzen dan etanol. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan kelarutan terhadap rendemen produk yang diperoleh. Setelah bereaksi, campuran yang diperoleh disaring akan diperoleh filtrat dan kristal. Hasil kristal yang diperoleh dikeringkan pada suhu kamar, kemudian ditimbang dan ditentukan titik lelehnya. Pada sintesis menggunakan pelarut etanol, setelah bereaksi campuran yang diperoleh tidak langsung disaring karena belum menunjukkan adanya produknya berupa kristal. Untuk mendapatkan kristal harus dilakukan pemurnian dengan destilasi fraksinasi penurunan tekanan. Hal ini dilakukan karena hasil refluks dengan pelarut etanol masih tetap berupa cairan. Etanol merupakan pelarut yang cenderung bersifat asam, H<sup>+</sup> pada etanol akan menyerang elektron bebas pada 2-aminopiridin dan terbentuk garam amonium. Perlu dilakukan vakum untuk memisahkan etanol dan produk. Digunakan variasi pelarut toluen, benzen dan etanol untuk mengetahui pengaruh keasaman pelarut terhadap reaksi yang terjadi. Dilihat dari sifat keasaman atau kemampuan melepas proton dari ketiga pelarut tersebut etanol bersifat paling asam. Etanol merupakan pelarut protik yang berperan sebagai donor proton dan akan mempercepat pelepasan H<sub>2</sub>O dalam reaksi eliminasi sehingga reaksi berjalan cepat dan diperoleh rendemen yang banyak. Sifat keasamaan dari ketiga pelarut adalah etanol > toluen > benzen. Dari tabel IV.1 dapat dilihat bahwa hasil sintesis dengan pelarut benzen mempunyai rendemen yang paling tinggi, yaitu sebesar 70,59 %, pelarut etanol mempunyai rendemen paling

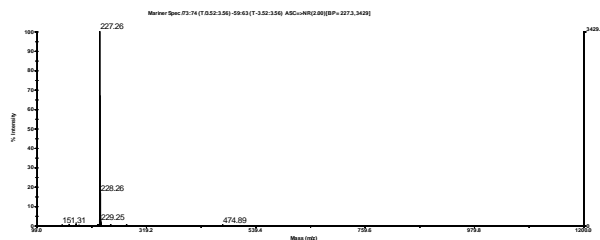
rendah, sebesar 29,70 %, ini disebabkan bahan dasar 2-aminopiridin bersifat higroskopis sehingga akan mengadakan ikatan hidrogen dengan proton dari etanol hal ini menunjukkan reaksi yang berjalan tidak sempurna.

Hasil produk sintesis senyawa turunan *azomethin* terlebih dahulu dianalisis awal menggunakan spektroskopi UV-Vis. Hasil analisis UV-Vis dapat dilihat pada gambar 1.



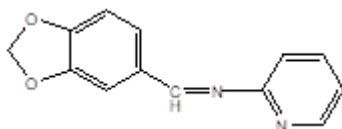
Gambar 1. Analisis UV-Vis Hasil sintesis dengan pelarut benzen

Dari gambar 1 dapat dilihat adanya puncak serapan 233 nm menunjukkan adanya gugus C=N (*azomethin*) [10]. Identifikasi menggunakan LC-MS ditunjukkan oleh kromatogram dan spectrogram senyawa turunan *azomethin* dapat dilihat pada gambar 2.



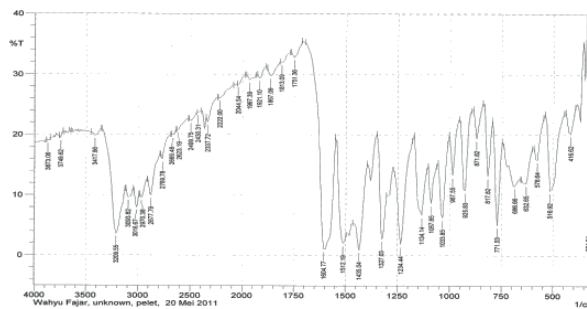
Gambar 2. Spektrogram senyawa senyawa turunan *azomethin*

Dari gambar 2 memperlihatkan memperlihatkan berat molekul pada m/z 227,26 [M+H]<sup>+</sup>. Hal ini menunjukkan bahwa berat molekul senyawa hasil sintesis adalah 227,26-1=226,26 yang mengindikasikan berat molekul m/z 226,26 [M<sup>+</sup>] yang identik dengan struktur *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amin (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



Gambar 3 Struktur *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine

Karakterisasi menggunakan FTIR dapat dilihat ada gambar 4.



Gambar 4. Spektra FTIR *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine

Panjang gelombang penting dari spektra FTIR *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Bilangan gelombang spektra FTIR *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine

Jenis vibrasi	Panjang gelombang
<i>azomethin</i> (C=N)	1604,77 cm <sup>-1</sup>
Vibrasi (C <sub>sp2</sub> -H)	3093,82 cm <sup>-1</sup>
C=C aromatik	1512,19 cm <sup>-1</sup>
Substitusi benzen posisi orto	771,53 cm <sup>-1</sup>
Substitusi benzen posisi para	817,82 cm <sup>-1</sup> , 871,82 cm <sup>-1</sup>
Vibrasi C-O	1234,44 cm <sup>-1</sup>
Vibrasi C <sub>sp3</sub> -H dari gugus metilen	2970,38 cm <sup>-1</sup> diperkuat 1435,04 cm <sup>-1</sup>

**Uji Aktivitas Inhibitor Korosi pada Logam Besi**

Pengaruh penambahan inhibitor hasil sintesis (*N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine) terhadap laju korosi logam besi dapat ditentukan melalui metode pengurangan berat (*weight loss*), yaitu dengan menghitung selisih berat besi sebelum dan sesudah direndam dalam larutan tanpa dan dengan penambahan inhibitor produk sintesis (Dwi dan Harmami, 2009). Senyawa *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine disiapkan dalam beberapa konsentrasi, yaitu 0,06 %, 0,12 %, 0,25 %, 0,05 % dan 1,00 % dengan perendaman dalam larutan inhibitor selama 4 jam, 6 jam, 1 hari dan 4 hari. Nilai laju korosi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Laju korosi logam besi pada variasi konsentrasi inhibitor *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine

konsentrasi (%)	Laju Korosi (mg cm <sup>-2</sup> hari <sup>-1</sup> )			
	4 jam	6 jam	1 hari	4 hari
0,00	1,40	4,13	4,23	5,81
0,06	2,20	2,53	4,33	4,98
0,12	2,00	2,80	3,73	2,21
0,25	2,20	1,38	4,60	5,15
0,50	3,20	2,66	4,63	5,61
1,00	1,20	2,40	3,43	4,90

Konsentrasi efektif senyawa turunan *azomethin* sebagai inhibitor korosi ditunjukkan pada konsentrasi 1 % dengan laju korosi yang mampu menghambat sampai  $1,2 \text{ mg cm}^{-2} \text{ hari}^{-1}$  pada perendaman selama 4 jam dan efisiensi inhibitor sebesar 14,28 %. Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat setelah penambahan larutan inhibitor produk sintesis terjadi kenaikan dan penurunan laju korosi pada logam besi. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan inhibisi larutan inhibitor produk sintesis kurang maksimal, karena proses adsorpsi yang kurang merata pada permukaan logam. Menurut Faya [1], berdasarkan proses adsorpsi pada permukaan logam, semakin besar konsentrasi larutan inhibitor maka laju korosi akan semakin kecil [4].

## 5. Kesimpulan

Senyawa turunan *azomethin*, *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine dari piperonal dan 2-aminopiridin. Pengaruh pelarut benzen pada suhu  $84 \text{ }^{\circ}\text{C}$  menghasilkan produk optimal yaitu 70,59 % dan titik leleh  $92,5\text{--}95,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Senyawa *N*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)pyridin-2-amine mempunyai aktivitas sebagai inhibitor korosi dengan laju korosi optimum sebesar  $1,2 \text{ mg cm}^{-2} \text{ hari}^{-1}$  dengan waktu perendaman 4 jam dan efisiensi inhibitor sebesar 14,28 % pada konsentrasi 1 %.

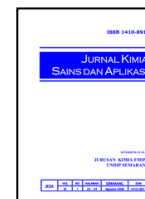
## 6. Daftar Pustaka

- [1] Lidya Faya Pengaruh inhibitor natrium hidrogen fosfat terhadap laju korosi baja dalam air laut, Jurusan Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang
- [2] Kenneth R. Trethewey, John Chamberlain, Korosi : Untuk Mahasiswa Sains dan Rekayasa, A.T.K. Widodo, Gramedia, Jakarta, 1991.
- [3] Mars Guy Fontana, Corrosion engineering, Tata McGraw-Hill Education, 2005.
- [4] Nnabuk O Eddy, Stanislav R Stoyanov, Eno E Ebenso, Fluoroquinolones as corrosion inhibitors for mild steel in acidic medium; experimental and theoretical studies, *International Journal of Electrochemical Science*, 5, (2010) 1127-1150
- [5] Rosita Dwi, M Harmami, Studi Inhibisi Korosi Baja Austenitik 304 dalam Media NaCl 3% dengan Menggunakan Inhibitor Asam-Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Biji Kapuk, Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya
- [6] P. Matheswaran, A. K. Ramasamy, A Study of Mild Steel Corrosion Using Adhatoda Vasica (AV) Extract as Inhibitor in Different Acid Medium, *E-Journal of Chemistry*, 7, 4, (2010) 1284-1289 [10.1155/2010/546360](http://dx.doi.org/10.1155/2010/546360)
- [7] Ralph J. Fessenden, Joan S. Fessenden, Kimia Organik A.H. Pudjaatmaka, Erlangga, Jakarta, 1994.
- [8] Majed M. Hania, Synthesis of Some Imines and Investigation of their Biological Activity, *E-Journal of Chemistry*, 6, 3, (2009) 629-632 <http://dx.doi.org/10.1155/2009/104058>
- [9] Mrunalini M. Deshpande, Subhash B. Junne, Devdatta V. Saraf, Prafullakumar A. Kulkarni, Synthesis and spectral analysis of some new lanthanide complexes derived from 2,4 and 2,5-

dihydroxy acetophenones and screened their antimicrobial activity, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 3, (2010) 453-458

- [10] Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, David L. Bryce, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5 ed., John Wiley and Sons Inc., New York, 1991.





## Perbandingan Penentuan Kadar Alumunium dalam Antasida Menggunakan Metode Spektrometri Tampak dengan Spektrometri Serapan Atom

Raharjo <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Pranata Laboratorium Pendidikan Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

### Article Info

#### Keywords:

Aluminium, Visible spectrometry, atomic absorption spectrometry

Kata kunci:  
 Aluminium,  
 spektrometri  
 tampak,  
 spektrometri  
 serapan atom

### Abstract

It has been done the comparison between visible spectrometry and atomic absorption spectrometry (AAS) methods in aluminium determination. By AAS method, sample solution was analyzed directly. Whereas by visible spectrometry method, the sample firstly was extracted by 8-Hydroxyquinoline in chloroform, and than the alumunium determined. Absorbancy was measured with ultra violet – visible spectrometer at 408 nm. The result of experiment show that the mean concentration of aluminium determined by AAS is  $81.01 \pm 0.95$  ppm and by visible spectrometry is  $79.70 \pm 1.64$  ppm. Student's – t test yields  $t_{\text{experiment}} 0.86$  and  $t_{\text{table}} 2.31$  ( $P=95\%$ ). It can be concluded both methods are not significantly different because  $t_{\text{experiment}}$  is less than  $t_{\text{table}}$ .

### Abstrak

Telah dilakukan uji banding metode penentuan kadar alumunium secara spektrometri tampak dengan spektrometri serapan atom (SSA). Penentuan kadar alumunium secara SSA dilakukan dengan menganalisis larutan sampel secara langsung, sedangkan analisis secara spektrometri tampak dilakukan dengan perlakuan awal ekstrasi menggunakan pereaksi 8-hidroksikuinolin dalam kloroform. Absorbansi diukur dengan spektrometer ultra ungu – tampak pada panjang gelombang 408 nm. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi rata – rata secara SSA adalah  $81,01 \pm 0,95$  ppm dan secara spektrometri tampak adalah  $79,70 \pm 1,64$  ppm. Hasil uji t-student menyatakan bahwa  $t_{\text{eksperimen}}$  sebesar 0,86 lebih kecil dari pada  $t_{\text{tabel}}$  yang besarnya 2,31 untuk  $P = 95\%$ . Hal ini dapat disimpulkan bahwa kedua metode tersebut tidak berbeda secara nyata.

### 1. Pendahuluan

Aluminium adalah logam yang sangat ringan dan kuat, oleh karena itu digunakan untuk membuat kendaraan yang ringan. Demikian pula aluminium banyak digunakan dalam bangunan modern seperti bingkai jendela dan kerangka ruang perkantoran <sup>(1)</sup>.

Pada industri pesawat terbang aluminium digunakan sebagai pelapis badan pesawat karena mempunyai sifat anti korosi dan ringan serta mudah dibentuk <sup>(2)</sup>.

Kandungan aluminium dalam suatu sampel dapat dianalisis dengan beberapa metode antara lain dengan

metode spektrometri serapan atom dan spektrometri tampak.

Pada penentuan kadar aluminium secara spektrometri serapan atom larutan sampel langsung dianalisis oleh spektrometer, sedangkan analisis secara spektrometri tampak dilakukan dengan perlakuan awal ekstraksi sampel dengan pereaksi 8-hidroksikuinolin dalam kloroform. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh keasaman larutan dan akan terbentuk kompleks aluminium-oksin yang larut dalam kloroform serta berwarna kuning. Absorbansi diukur dengan spektrometer ultra ungu – tampak pada panjang gelombang optimum<sup>(3)</sup>.

Untuk memperoleh keseksamaan hasil kedua metode tersebut maka perlu diadakan uji banding antar metode secara statistik dengan menggunakan uji t-student.

**2. Metodologi penelitian**

**Alat :** Spektrometer serapan atom merk Perkin Elmer, Spektrometer ultra ungu – tampak V-200 merk LW scientific, Neraca analitik merk Adam, Stopwatch, pH meter, corong pisah dan perangkat gelas.

**Bahan:**

**Larutan Sampel:** sebanyak 10,395 g antasida dilarutkan dalam labu ukur 1000 mL yang berisi 15 mL HCl dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Kemudian diambil sebanyak 20 mL untuk diencerkan menjadi 250 mL.

**Larutan Bufer asetat:** sebanyak 25 g amonium asetat dilarutkan dalam 70 mL aquabides dan 5 mL asam asetat glasial kemudian ditambah aquabides mencapai 100 mL.

**Larutan Oksin:** sebanyak 2 g 8-hidroksikuinolin dilarutkan dalam kloroform sampai 100 mL

**Larutan standar aluminium** dengan konsentrasi 25, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

**Eksperimen**

Metode spektrometri serapan atom larutan sampel langsung dianalisis dengan spektrometer serapan atom pada panjang gelombang 390,3 nm, kecepatan alir asetilen 2 L/menit dan kecepatan alir N<sub>2</sub>O 4 L/menit.

Metode spektrometri tampak: larutan sampel sebanyak 30 mL dicampur dengan 3 mL larutan bufer asetat. Kemudian campuran tersebut diekstraksi dengan 20 mL larutan oksin dan dikocok selama 2 menit. Fasa organik dipisahkan, disaring dan diukur absorbansinya pada 408 nm dengan pembanding larutan blanko. Prosedur yang lama dikerjakan pula untuk larutan standar<sup>(4)</sup>.

**3. Hasil dan Pembahasan**

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa  $t_{eksperimen}$  lebih kecil daripada  $t_{tabel}$ .

Tabel 1. Konsentrasi Aluminium yang dianalisis secara SSA dan Spektrometri tampak.

No	Al (ppm)	
	Metode AAS	Metode tampak
1	80,93	79,12
2	81,32	79,12
3	82,42	81,99
4	79,93	77,69
5	80,43	80,56
	Purata = 81,01	Purata = 79,70
	SD = 0,95	SD = 1,64
$t_{eksperimen} = 0,85$ $t_{tabel} = 2,31$		

Spektrometri tampak merupakan metode analisis berdasarkan absorpsi energi sinar tampak oleh molekul berwarna. Aluminium dapat membentuk senyawa kompleks berwarna kuning bila direaksikan dengan 8-hidroksikuinolin atau oksin dengan membentuk aluminium oksinat. Oleh karena itu aluminium dapat dianalisis dengan metode spektrometri tampak dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum 408 nm. Ekstraksi dengan pelarut kloroform diperlukan untuk memperoleh kadar aluminium oksinat sebanyak mungkin dan bebas dari interferensi logam-logam lain.

Spektrometri serapan atom juga merupakan metode analisis yang berdasarkan absorpsi energi sinar tetapi oleh atom-atom dalam keadaan dasar dan dalam fasa gas. Analisis aluminium dengan metode inidiaksanakan dengan bahan bakar campuran gas asetilen dan N<sub>2</sub>O agar diperoleh suhu yang sesuai untuk pembentukan gas atom dalam kondisi dasar sebelum menyerap energi sinar. Bahan bakar asetilen dan udara tidak dipilih karena suhu yang dihasilkan lebih rendah daripada suhu yang diperlukan aluminium untuk berubah dari senyawa menjadi gas atom.

**4. Kesimpulan**

Kadar aluminium dalam tablet antasida yang ditentukan secara SSA adalah  $81,01 \pm 0,95$  ppm sedangkan secara spektrometri tampak adalah  $79,70 \pm 1,64$  ppm. Uji statistic dengan t -student menunjukkan  $t_{eksperimen}$  0,85 dan  $t_{tabel}$  2,31 dengan F= 95%, sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua metode tidak berbeda secara nyata.

**5. Referensi**

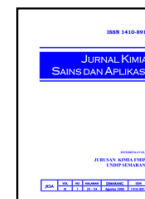
Achmad H., (1992), *Kimia Unsur dan Radiokimia*. PT Citra Aditya Bakti, Bandung, halaman 122 - 123.

Farhial and Lawrence, (1952), *Industrial Toxicology*, 2<sup>nd</sup> edition, The Williams and Wilkins Baltimore, p 10 - 11.

APHA, (1992), *Standard Methodes for The Examination of Water and Waste Water*, 8<sup>th</sup> edition, Washington DC, p IV.25 - IV.35.

Fries J. and Getrost H., (1975), *Organic Reagents for Trace Analysis*, E. Merck, Darmstadt. p 22 - 25.

Miller J.C. and Miller J.N., (1988), *Statistics for Analytical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, John Willey & Sons, New York, p 55 - 58.



## Pengaruh Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Spesifik Protease Ekstraseluler dan Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura

Rahmad Budiharjo <sup>a</sup>, Purbowatiningrum Ria Sarjono <sup>a</sup> dan Mukhammad Asy'ari <sup>a\*</sup>

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

\* Corresponding author: [asyari@live.undip.ac.id](mailto:asyari@live.undip.ac.id)

Article Info	Abstract
<p>Keywords: halophilic bacteria, proteases, azocasein, NaCl, specific activity</p>	<p>Halophilic protease can be utilized on food fermentation, such as on the manufacturing of fish sauce. The objectives of this study are to obtain halophilic bacteria from bittern isolate of Madura salt ponds, to isolate extra cellular halophilic protease and to determine the influence of NaCl concentration on the specific activity of halophilic protease. Adaptations of halophilic bacteria in HSB medium (Halophile Synthetic Broth). Protease activity measurement was done using azocasein substrat, and protein concentration was measured by lowry method. From this study, halophilic bacteria from the bittern isolate of Madura salt embankment were obtained. The bacteria grew optimally on NaCl concentration of 4% (w/v) with highest specific activity of extra cellular halophilic protease of 58.537 unit/mg of protein measured on the fraction 4 (60–80%). Furthermore, it was also observed that NaCl addition could increase the enzyme's specific activity to be 113.78 unit/mg of protein with the optimum NaCl concentration of 0.750 M.</p>
<p>Kata kunci: bakteri halofilik, protease, azokasein, NaCl, aktivitas spesifik</p>	<p><b>Abstrak</b></p> <p>Protease halofilik dapat dimanfaatkan pada proses fermentasi makanan seperti pada pembuatan kecap ikan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh bakteri halofilik dari isolat bittern tambak garam Madura dan mengisolasi protease halofilik ekstraseluler serta menentukan pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas spesifik protease halofilik. Bakteri halofilik ditumbuhkan pada media HSB (<i>Halophile Synthetic Broth</i>). Penentuan aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan substrat azokasein dan kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Berdasarkan penelitian diperoleh bakteri halofilik isolat bittern tambak garam Madura yang tumbuh optimal pada konsentrasi NaCl 4 % (b/v), dengan aktivitas spesifik protease halofilik ekstraseluler tertinggi pada fraksi 4 (60–80 %) sebesar 58,537 Unit/mg protein. Adanya penambahan garam NaCl dapat meningkatkan aktivitas protease halofilik. Pada penelitian ini, aktivitas spesifik protease halofilik meningkat menjadi 113,78 Unit/mg protein dengan konsentrasi optimal NaCl 0,750 M.</p>

### 1. Pendahuluan

Madura merupakan salah satu sentra industri garam yang cukup besar di Indonesia. Para petani garam umumnya hanya mengambil kristal garam (NaCl) saja, sedangkan sisa hasil pemekatan (*bittern*) belum

termanfaatkan. *Bittern* mengandung berbagai macam mineral seperti  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$ , NaCl dan KCl serta mikroorganisme yang tahan terhadap kadar garam tinggi, salah satunya adalah bakteri halofilik [1]. Bakteri halofilik dibedakan berdasarkan kemampuan hidup pada kadar NaCl yang berbeda-beda. Jenis bakteri

halofilik "rendah" mampu tumbuh optimal pada 2–5% NaCl, jenis "sedang" tumbuh optimal pada 5–20% NaCl dan jenis "ekstrim" tumbuh optimal pada 20–30% NaCl. Sedangkan bakteri non halofil tumbuh optimal pada kadar garam kurang dari 2% NaCl [2]. Kemampuan hidup pada kadar garam tinggi dikarenakan bakteri halofilik mampu mengakumulasi suatu zat organik terlarut di dalam sitoplasmanya. Tujuannya adalah untuk mencegah hilangnya cairan dari dalam sel akibat dari tingginya tekanan osmotik di luar sel karena meningkatnya konsentrasi NaCl. Zat organik terlarut meliputi *glycine betaine* dan *ectoin* [2].

Bakteri halofilik mampu menghasilkan enzim hidrolitik salah satunya adalah protease, yang berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis protein menjadi oligopeptida dan asam-asam aminonya [3]. Penentuan aktivitas protease dilakukan berdasarkan berkurangnya substrat azokasein pada kondisi percobaan. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai besarnya aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan absorbansi 1% per mL pada panjang gelombang 440 nm pada kondisi percobaan [4]. Protease halofilik dapat dimanfaatkan pada proses fermentasi makanan seperti pada pembuatan kecap ikan [1]. Enzim halofilik mampu bertahan pada kadar garam tinggi, hal ini dikarenakan sebagian besar asam amino yang menyusun enzim halofil merupakan asam amino yang bersifat asam, yaitu asam amino yang memiliki rantai samping gugus karboksilat (COOH), misalnya asam glutamat dan aspartat [5].

Salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas protease halofilik adalah adanya garam, terutama NaCl [6, 7]. Kation dari garam akan mempertahankan kestabilan struktur protease halofilik melalui cara berikatan dengan muatan-muatan negatif dari gugus asam pada permukaan protease halofilik. Selain itu, adanya kation juga berperan dalam efek *shielding* (perlindungan) terhadap pengaruh kondisi lingkungan [1]. Berdasarkan penelitian Vidyasagar *dkk.* [8] berhasil menentukan aktivitas spesifik protease halofilik tertinggi yaitu sebesar 350 Unit/mg pada konsentrasi NaCl 20%.

Pengaruh garam NaCl tidak hanya pada pertumbuhan bakteri halofilik tapi aktivitas enzim halofilik juga. Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan pengaruh konsentrasi NaCl terhadap aktivitas spesifik protease ekstraseluler dan pertumbuhan bakteri halofilik isolat *bitten* tambak garam Madura.

## 2. Metode Penelitian

### Isolasi bakteri halofilik

Sampel *bittern* sebanyak 10 µL diinokulasikan kedalam 100 mL media *Enrichment halophile Broth* (EHB) yang terdiri dari 3 g glukosa; 1,5 g tripton; 1,5 g yeast ekstrak; 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 30 g NaCl dan 30 ml *bittern*, kemudian diinkubasi dalam orbital shaker inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 250 rpm. Sebanyak 10 µL isolat bakteri hasil dari media EHB diinokulasikan pada media *Enrichment Halophile*

*Agar* (EHA), menggunakan dengan metode spread. Inkubasi dalam inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam. Hasil dari metode spread selanjutnya diinokulasikan pada media EHA dengan metode. Hasil dari metode streak diambil 1 ose pada goresan terakhir, kemudian diinokulasikan dalam media EHB.

### Pengadaptasian bakteri pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Pengadaptasian dilakukan dengan mengganti komponen *bittern* dengan ASW (*Artificial Sea Water*) pada media. Isolat bakteri sebanyak 10 µL dari stok media EHB diinokulasikan ke dalam 100 mL media HSB. Pengadaptasian dilakukan dengan pengaturan komposisi *bittern* dan ASW, kemudian diinkubasi dalam shaker inkubator pada temperatur 37 °C selama 24 jam dengan kecepatan 250 rpm.

### Uji morfologi dan pewarnaan Gram

Kultur bakteri dari media EHB dan HSB ditambah dengan larutan kristal ungu, reagen gram iodine, larutan alkohol aseton dan safranin. Pengamatan morfologi dan pewarnaan gram dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1500X

### Penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

Sebanyak 10 µL kultur hasil peremajaan (sebagai starter) diambil dan diinokulasikan pada 50 mL media HSB (variasi konsentrasi NaCl (%): 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 ). Inkubasi dalam orbital shaker inkubator pada suhu 37 °C selama 32 jam. Hasil inokulasi bakteri halofilik pada media HSB dengan variasi konsentrasi NaCl, selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas protease ekstrak kasar.

### Produksi enzim protease

Isolat bakteri hasil *starter* diambil 100 µL, diinokulasikan pada 1 liter media HSB dan diinkubasi dalam *orbital shaker inkubator* pada suhu 37 °C selama 32 jam berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri dan konsentrasi NaCl 4% berdasarkan penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

### Fraksinasi dengan garam amonium sulfat

Enzim ekstrak kasar dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0–20% (F1), 20–40% (F2), 40–60% (F3), 60–80% (F4), 80–100% (F5). Endapan dari setiap fraksi dipisahkan dengan sentrifugasi bertingkat, setrifugasi awal pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit dan 14000 rpm pada sentrifugasi berikutnya. Endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M, pH 8,0. Hasil fraksinasi kemudian dimurnikan kembali melalui proses dialisis dengan menggunakan membran selofan dan bufer fosfat 0,0005 M, pH 8,0.



Uji aktivitas enzim

Aktivitas protease ditentukan berdasarkan kemampuan protease mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan peptida pada substrat azokasein 2 % (b/v) selama 30 menit. Untuk larutan sampel, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M pH 8,0 ditambah dengan aquades 0,625 mL dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2 %, kemudian diinkubasi pada suhu 4,0 °C selama 5 menit dalam *shaker water bath incubator*. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu 40 °C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*. Setelah itu ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10 %. Campuran dikocok dan diinkubasi didalam air es sesaat. Untuk larutan blanko ( $t_0$ ), sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 M pH 8,0 ditambah 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 telah dipanaskan. Campuran dikocok dan diinkubasi didalam air es sesaat. Larutan blanko dan larutan sampel disentrifus pada 6000 rpm selama 30 menit. Masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada 440 nm [9]. Kadar protein dapat ditentukan dengan menggunakan metode *Lowry* sehingga akan diperoleh nilai aktivitas spesifik protease.

Penentuan konsentrasi optimal NaCl terhadap aktivitas spesifik protease

Penentuan konsentrasi optimal NaCl dilakukan dengan menentukan aktivitas protease ekstraseluler pada berbagai konsentrasi NaCl (M) yaitu 0,125; 0,175; 0,225; 0,250; 0,500; 0,750; 0,100; 1,250 dan 1,500.

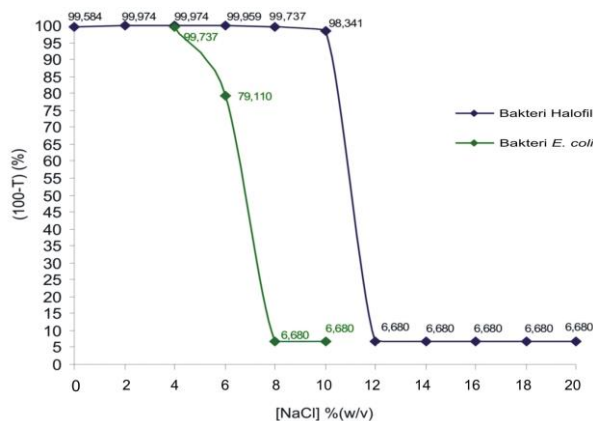
3. Hasil dan Pembahasan

Koloni tunggal bakteri halofilik telah berhasil diisolasi dari air pekatan sisa (*bittern*) tambak garam Madura menggunakan media *Enrichment Halophile Broth* (EHB). Kultur bakteri halofilik pada media EHB selanjutnya diadaptasikan pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB) secara bertahap agar diperoleh bakteri yang mampu beradaptasi pada media sintetis. Tujuan dari pengadaptasian adalah agar bakteri dapat ditumbuhkan kapan dan dimana saja tanpa tergantung pada sumber alaminya (*bittern*). Bakteri yang ditumbuhkan dalam media EHB dan HSB merupakan bakteri yang sama. Hal ini terlihat dari hasil morfologi berbentuk bulat (*coccus*) dan gram negatif.

Penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

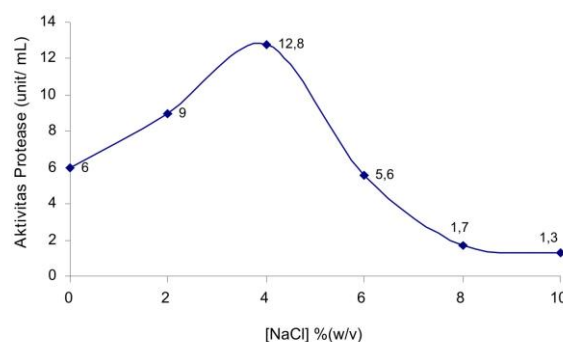
Penentuan konsentrasi optimal NaCl bertujuan untuk mendapatkan pertumbuhan bakteri yang optimal dan untuk menentukan jenis bakteri halofiliknya. Penginokulasian bakteri halofilik dilakukan pada media HSB dengan konsentrasi NaCl yang berbeda, selama waktu inkubasi 32 jam berdasarkan kurva pertumbuhan yang diperoleh. Perbedaan tingkat kekeruhan kultur pada berbagai konsentrasi NaCl menunjukkan adanya variasi pertumbuhan bakteri halofilik. Pertumbuhan

optimal bakteri halofilik terjadi pada konsentrasi NaCl 2% dan 4% ditunjukkan oleh nilai (100-T) sebesar 99,974 % (Gambar 1).



Gambar 1. Konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik.

Selain melakukan penentuan konsentrasi optimal NaCl untuk pertumbuhan bakteri halofilik, pada penelitian ini juga dilakukan penentuan aktivitas protease ekstraseluler yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi NaCl 4% merupakan konsentrasi optimal NaCl dengan aktivitas protease sebesar 12,8 Unit/mL (Gambar 2), sehingga bakteri halofilik ini termasuk jenis halofilik “rendah” yang tumbuh optimal pada 2-5% NaCl.



Gambar 2. Aktivitas protease ekstrak kasar halofil pada berbagai konsentrasi NaCl

Pada umumnya jenis bakteri halofilik ”rendah” dapat beradaptasi dengan konsentrasi garam tinggi melalui mekanisme akumulasi zat organik di dalam sitoplasmanya [2].

Fraksinasi Amonium Sulfat Bertingkat

Fraksinasi dilakukan untuk memurnikan enzim secara bertingkat menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda untuk memisahkan enzim protease dari protein lainnya. Penambahan garam ammonium sulfat akan menurunkan kelarutan protein karena terjadi kompetisi antara ion garam yang ditambahkan dengan protein yang terlarut sehingga terjadi efek *salting out*. Fraksinasi ammonium sulfat dilakukan dengan tingkat kejenuhan 0-20% (F1), 20-40% (F2), 40-60% (F3), 60-80% (F4), 80-100% (F5). Setiap tahap fraksinasi diikuti dengan uji



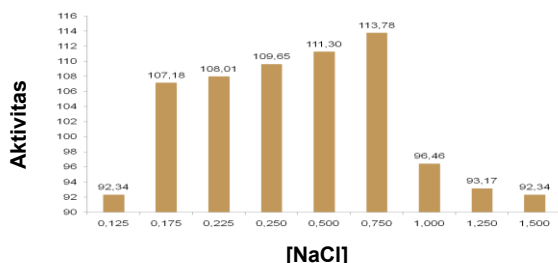
aktivitas protease yang terdapat di dalamnya sehingga dapat ditentukan fraksi optimalnya. Berdasarkan tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada fraksi 4 (F4) yaitu sebesar 58,537 Unit/mg protein, sehingga fraksi ini yang digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil fraksinasi Amonium Sulfat protease ekstraseluler dari bakteri halofilik

Fraksi Enzim	Aktivitas Enzim (Unit/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg protein)	Kemurnian
EK	14,4	0,62833	22,917	1,000
F1	2,0	0,12314	16,242	0,708
F2	8,2	0,21240	38,606	1,685
F3	7,9	0,28796	27,434	1,197
F4	7,1	0,12129	58,537	2,554
F5	3,6	0,11759	30,614	1,335

**Penentuan konsentrasi optimal NaCl terhadap aktivitas spesifik protease halofilik**

Aktivitas spesifik protease halofilik sebesar 113,78 Unit/mg protein diperoleh pada konsentrasi optimal NaCl 0,75 M seperti disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Aktivitas spesifik protease halofilik pada berbagai konsentrasi NaCl

**4. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian diperoleh bahwa bakteri halofilik isolat bittern tambak garam Madura tumbuh optimal pada konsentrasi NaCl 4 % (b/v), aktivitas spesifik protease halofilik ekstraseluler tertinggi pada fraksi 4 (60–80 %) sebesar 58,537 Unit/mg protein. Penambahan garam NaCl secara umum dapat meningkatkan aktivitas protease halofilik. Pada konsentrasi NaCl optimal 0,75 M dapat meningkatkan aktivitas spesifik protease halofilik sebesar 113,78 Unit/mg protein.

**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] 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.

[4] Jesse Charney, Rudolph M. Tomarelli, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *Journal of Biological Chemistry*, 171, 2, (1947) 501–505

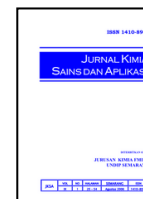
[5] Clive Edwards, *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill, 1990.

[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] Weraset 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



## Sintesis Lempung Terpillar Polikation Aluminium Sebagai Adsorben Indigo Karmina

Ari Kurniawan<sup>a</sup>, Ahmad Suseno<sup>a</sup>, Adi Darmawan<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

\* Corresponding author: [adidarmawan@live.undip.ac.id](mailto:adidarmawan@live.undip.ac.id)

### Article Info

Keywords:  
 Pillared clay,  
 adsorption, indigo  
 carmine

Kata kunci:  
 Lempung terpillar,  
 adsorpsi, indigo  
 karmina

### Abstract

Clay is plastic in wet conditions where there is an interlayer swelling, but there is no a permanent pore. This shortage can be overcome by converting the natural clay into a pillared clay. Clay pillarization was conducted by intercalation of Al polycation on natural clay followed by calcination. The synthesis results were characterized by an X-ray diffractometer. The indigo carmine adsorption was analyzed by a uv-vis spectrophotometer. X-ray diffraction results indicated that increasing of the Al/Clay ratio could improve the crystallinity of the pillared clay however it did not affect the basal spacing. Increased calcination temperature led to decrease the crystallinity and basal spacing of Aluminum-pillared clays. The largest basal spacing was produced by pillared clay calcined at 300°C which was 18.03 Å. The activity test on indigo carmine adsorbent showed that increased calcination temperature in Al-pillared clay synthesis resulted in decreased adsorption ability. Whereas the increase in the Al/Clay ratio increased the adsorption ability. The pillared clay with an Al/clay ratio of 2 and the calcination temperature of 300°C was able to adsorb indigo carmine of 88.99%.

### Abstrak

Lempung mempunyai sifat plastis pada keadaan basah, di mana terjadi pengembangan antarlapis namun tidak mempunyai pori yang permanen. Kekurangan tersebut dapat diatasi dengan mengubah lempung alam menjadi lempung terpillar. Pilarisasi lempung dilakukan dengan interkalasi polikation Al pada lempung alam yang dilanjutkan dengan kalsinasi. Hasil sintesis dikarakterisasi dengan difraktometer sinar-X. Analisis indigo karmina hasil adsorpsi dilakukan menggunakan spektrofotometer uv-vis. Hasil difraksi sinar-x menunjukkan bahwa peningkatan rasio Al/lempung mampu meningkatkan kristalinitas lempung terpillar, tetapi tidak mempengaruhi ukuran basal spacing-nya. Peningkatan suhu kalsinasi menyebabkan penurunan kristalinitas dan basal spacing dari lempung terpillar Aluminium. Basal spacing yang terbesar dihasilkan oleh lempung terpillar yang kalsinasi pada suhu 300°C yaitu 18,03 Å. Uji aktifitas sebagai adsorben indigo karmina menunjukkan bahwa meningkatnya suhu kalsinasi pada sintesis lempung terpillar Al menyebabkan kemampuan adsorpsi menurun. Sedangkan dengan meningkatnya rasio Al/lempung meningkatkan kemampuan adsorpsi. Lempung terpillar dengan rasio Al/lempung = 2 dan suhu kalsinasi 300°C mampu mengadsorpsi indigo karmina sebesar 88,99%.

### 1. Pendahuluan

Lempung merupakan material yang berlimpah yang belum dimanfaatkan secara optimal. Secara morfologis

tanah lempung umumnya berwarna kecoklat-coklatan dan mudah dibentuk dalam keadaan basah serta mengeras dengan warna kemerah-merahan jika dibakar

[1]. Dalam kehidupan sehari-hari tanah lempung digunakan sebagai bahan pembuat batu bata, tembikar dan genteng. Lempung mempunyai sifat plastis pada keadaan basah, di mana pada saat kontak dengan air lempung menunjukkan pengembangan antarlapis yang menyebabkan volumenya meningkat menjadi dua kali lipat [2]. Lempung juga sangat bermanfaat untuk katalis, penukar ion dan adsorben, namun mempunyai kekurangan yaitu tidak mempunyai pori yang permanen dan kemampuan adsorpsi yang rendah [3].

Hasil penelitian-penelitian sebelumnya [3-5], menunjukkan bahwa kekurangan tersebut dapat diatasi dengan mengubah struktur lempung menjadi struktur berpori. Dengan proses pertukaran kation antar lapisan lempung atau dengan penyisipan lapisan lempung oleh gugus meruah dan dilanjutkan dengan kalsinasi akan terbentuk tiang-tiang penyangga lapisan yang bersifat permanen yang menghasilkan suatu sistem pori. Lempung yang mempunyai sistem pori tersebut dinamakan dengan *lempung terpillar*. Ukuran pori lempung terpillar bervariasi sekitar 15-35 Å yang tergantung pada senyawa yang digunakan sebagai pemilar. Lempung terpillar yang dihasilkan banyak mempunyai keunggulan diantaranya ukuran pori yang besar, kemampuan adsorpsi yang lebih tinggi dibanding lempung asal, stabilitas termal tinggi, dan luas permukaan yang besar [3].

Berdasarkan penelitian [3] diketahui bahwa lempung terpillar Al memperlihatkan ukuran pori yang relatif seragam, hidrolisisnya mudah dikendalikan, dan ukuran pilarnya tidak terlalu peka oleh perubahan keadaan hidrolisis. Lempung terpillar Al mempunyai stabilitas termal yang cukup tinggi mencapai suhu 700°C [6]. Jarak antar lapis yang dihasilkan berkisar antara 12-18 Å yang dipengaruhi oleh kondisi sintesisnya [5].

Lempung alam Banyumas selama ini penggunaannya hanya sebatas sebagai bahan baku pembuatan genteng dan keramik. Dengan mengubah struktur lempung menjadi struktur berpori, maka akan dihasilkan material baru yang dapat digunakan sebagai adsorben molekul zat warna yang berukuran besar. Rasio Al/lempung dan suhu kalsinasi merupakan dua di antara sekian banyak variabel yang mempengaruhi sifat lempung terpillar yang akan dihasilkan. Berdasarkan fenomena tersebut maka pada penelitian ini dipelajari metode pembuatan lempung terpillar dengan proses interkalasi polimer aluminium pada lempung alam Banyumas untuk adsorpsi pewarna indigo karmina. Adapun variabel kajian adalah metode pembuatan lempung terpillar khususnya perbandingan relatif konsentrasi aluminium dengan berat lempung dan efektifitas adsorpsinya terhadap zat warna indigo karmina. Diharapkan dengan melakukan variasi rasio konsentrasi Al/berat lempung dapat diperoleh komposisi yang paling optimal untuk menghasilkan *basal spacing* yang relatif besar, serta pengaruh ukuran *basal spacing* dan kristalinitas lempung terpillar yang dihasilkan terhadap kemampuannya mengadsorpsi indigo karmina, sehingga lempung terpillar Al yang

dihasilkan dapat dimanfaatkan sebagai adsorben senyawa dengan molekul berukuran besar.

## 2. Metodologi Penelitian

Sampel yang digunakan adalah lempung alam yang berasal dari Banyumas yang biasa digunakan sebagai bahan baku pembuatan genteng dan keramik.

Bahan yang digunakan yaitu, kristal aluminium klorida heksahidrat  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan kristal natrium hidroksida (NaOH) untuk pembuatan larutan pemilar, aquades, larutan  $\text{AgNO}_3$  untuk uji bebas klorida, dan indigo karmina untuk uji adsorpsi. Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas, *Magnetic stirrer*, *Oven*, *Furnace*, Spektrofotometer UV/VIS *specronic 120 Shimadzu*, difraktometer sinar-X *XRD-6000 Shimadzu*.

### Preparasi Lempung

Lempung alam disuspensikan ke dalam air kemudian dibiarkan selama 5 menit. Suspensi yang terbentuk didekantasi dan diambil filtratnya. Hal ini diulang-ulang dengan waktu pendiaman 10 dan 15 menit hingga dihasilkan suatu lempung alam yang bebas dari pengotor. Lempung kemudian dikeringkan pada suhu 70°C selama 1 malam. Setelah kering, lempung digerus dan disaring dengan ukuran 200 mesh.

### Pembuatan Larutan Pemilar

Variasi konsentrasi Al dibuat berdasarkan berat lempung, di mana berat lempung dikonstantkan sebesar 10 gram. Larutan pemilar polikation aluminium ( $\text{Al}_3$ ) dibuat dengan menambahkan sedikit demi sedikit larutan NaOH pada larutan  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  kemudian di tambah aquades sampai volume 500 mL sehingga diperoleh perbandingan molar ( $\text{OH}/\text{Al}$ ) = 2. Larutan pemilar lalu didiamkan pada suhu 70°C selama 5 hari. Kemudian didiamkan hingga suhu kamar.

Tabel 1. Perbandingan mol larutan pemilar

Sampel	Al/lempung	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mmol)	NaOH (mmol)
A	0,5	5	10
B	2	20	40
C	4	40	80

### Pembuatan Lempung Terpillar Aluminium

Lima ratus mililiter larutan pemilar yang telah dibuat kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit pada suspensi 10 gram lempung dalam 500 mL akuades (2%) dan diaduk selama selama 24 jam. Sebelumnya lempung telah disuspensi selama 3 jam. Suspensi dimasukkan ke dalam penyaring dan dicuci dengan dialisis menggunakan aquades hingga ion klorida hilang dengan uji menggunakan larutan  $\text{AgNO}_3$ . Padatan yang didapat dikeringkan pada suhu 75°C kemudian masing-masing dikalsinasi pada suhu 300, 450 dan 600°C selama 2 jam dengan kecepatan pemanasan 2°C/menit.

### Karakterisasi Lempung Terpillar

Lempung terpillar dikarakterisasi menggunakan XRD (*X-ray Diffraction*) untuk mengetahui *basal spacing* dan kristalinitasnya.

#### Uji Adsorpsi Terhadap Indigo Karmina

Sepuluh mililiter larutan indigo 30 ppm dicampur dengan 200 mg lempung terpillar Al (adsorben), dan diaduk selama 30 menit. Jumlah indigo yang teradsorpsi dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada  $\lambda = 610$  nm dan ditentukan menggunakan kurva standar.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Pada bab ini akan dibahas mengenai sintesis lempung terpillar aluminium, pengaruh variasi suhu kalsinasi dan rasio [Al]/lempung terhadap *basal spacing* dan kristalinitas lempung terpillar yang dihasilkan. Karakterisasi dilakukan menggunakan difraktometer sinar x. Uji aktifitas adsorpsi lempung terpillar hasil sintesis dilakukan terhadap larutan indigo karmina. Analisis indigo karmina hasil adsorpsi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Difraktogram yang dihasilkan pada daerah  $2\theta$  dibawah  $10^\circ$  menunjukkan ukuran *basal spacing*, kristalinitas, distribusi pilar dan ukuran pori di antar lapis lempung.

#### Sintesis Lempung Terpillar Aluminium

Sintesis lempung terpillar aluminium terdiri dari 4 tahap. Pertama, pemurnian lempung alam yang akan dipilarisasi, kedua pembuatan larutan pemilar, ketiga, pilarisasi lempung dengan interkalasi polikation Al, keempat, kalsinasi untuk membentuk lempung terpillar yang stabil.

Pemurnian dilakukan untuk menghilangkan partikel lain yang terdapat pada lempung seperti pasir, bebatuan dan logam-logam (Fe, Mg). Karena adanya partikel lain dalam lempung akan mempengaruhi proses interkalasi larutan pemilar pada lempung. Proses pemurnian dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan berat jenis lempung dengan partikel pengotor, di mana partikel pengotor mempunyai berat jenis lebih besar dibandingkan dengan partikel lempung. Partikel pengotor akan mengendap lebih cepat dari pada partikel-partikel lempung, sehingga partikel pengotor dapat dipisahkan dari lempung.

Larutan pemilar dibuat dengan menghidrolisis  $\text{AlCl}_3$  menggunakan NaOH untuk menghasilkan ion Keggin  $[\text{Al}_3\text{O}_4(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$ . Al digunakan sebagai larutan pemilar karena lempung terpillar Al mempunyai ukuran pori yang relatif seragam, hidrolisisnya mudah dikendalikan, dan ukuran pilarnya tidak terlalu peka oleh perubahan keadaan hidrolisis [3].

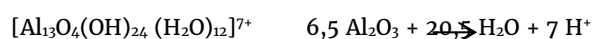
Perbandingan OH/Al langsung berhubungan dengan pH larutan, di mana keasaman merupakan faktor yang penting untuk mengendalikan muatan polikation Al. Pada penelitian ini digunakan OH/Al = 2, karena menurut [7] pada range OH/Al 1,5-2,3 garam aluminium lebih banyak berada dalam bentuk ion

Keggin. Pembuatan larutan dilakukan pada suhu  $70^\circ\text{C}$  selama 5 hari. Hal tersebut dilakukan karena pemanasan akan meningkatkan derajat polimerisasi yang disebabkan oleh peningkatan kecepatan hidrolisisnya [5].

Proses interkalasi dilakukan dengan penambahan larutan pemilar pada suspensi lempung. Dalam proses ini terjadi pertukaran ion antara kation-kation penyeimbang antar lapis seperti  $\text{Na}^+$  dan polikation aluminium yang terdapat dalam larutan pemilar. Dua persen suspensi lempung dalam air digunakan untuk mengembangkan lempung, yang akan mempermudah interkalasi. Interkalasi dilakukan dengan pengadukan menggunakan stirer selama 24 jam yang juga membantu proses interkalasi polikation aluminium ke dalam antar lapis lempung. Setelah proses interkalasi dihasilkan suspensi lempung yang lebih mengembang dibandingkan sebelum proses interkalasi.

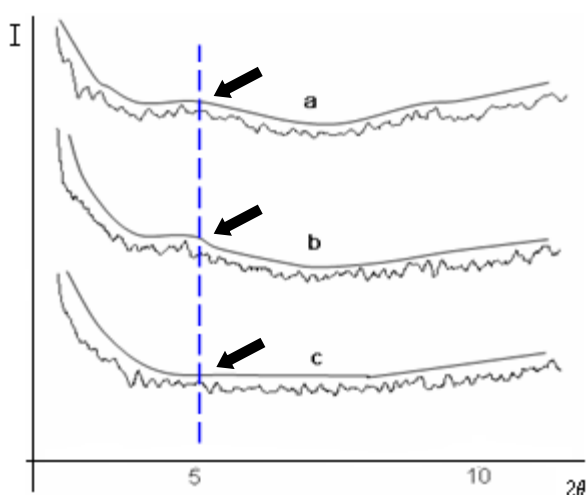
Suspensi lempung yang telah diinterkalasi dipisahkan dan dicuci menggunakan aquades untuk menghilangkan larutan pemilar yang berlebih dan ion  $\text{Cl}^-$ . Menurut Cool dan Vansant [5] pencucian suspensi lempung terinterkalasi meningkatkan kualitas lempung terpillar yang dibuat. Pencucian juga meningkatkan distribusi pilar yang seragam, menghasilkan jarak antar lapis yang lebih besar dibandingkan tanpa pencucian. Tidak terdapatnya ion  $\text{Cl}^-$  dalam suspensi dapat ditentukan dengan penambahan  $\text{AgNO}_3$  pada filtrat. Apabila sudah tidak terbentuk lagi endapan putih yang menunjukkan endapan  $\text{AgCl}$ , maka ion  $\text{Cl}^-$  sudah tidak terdapat dalam suspensi.

Proses kalsinasi merubah polikation aluminium menjadi pilar alumina oksida yang kaku. Proses pemanasan penting agar diperoleh lempung terpillar dengan mikropori yang permanen. Selama kalsinasi terjadi reaksi dehidrasi dan dehidroksilasi polikation untuk menghasilkan oksida netral. Seperti diperlihatkan oleh reaksi di bawah ini [5].



Kalsinasi dilakukan pada suhu  $300^\circ\text{C}$ ,  $400^\circ\text{C}$  dan  $600^\circ\text{C}$  untuk mengetahui pengaruh suhu kalsinasi pada lempung terpillar yang dihasilkan. Proses kalsinasi dilakukan selama 2 jam karena dianggap bahwa dalam waktu tersebut kalsinasi berlangsung sempurna. Dan kecepatan pemanasan  $2^\circ/\text{menit}$  untuk memberikan kesempatan pada masing-masing tahap dalam proses kalsinasi berlangsung dengan sempurna.

4.1. Pengaruh variasi rasio Al/lempung

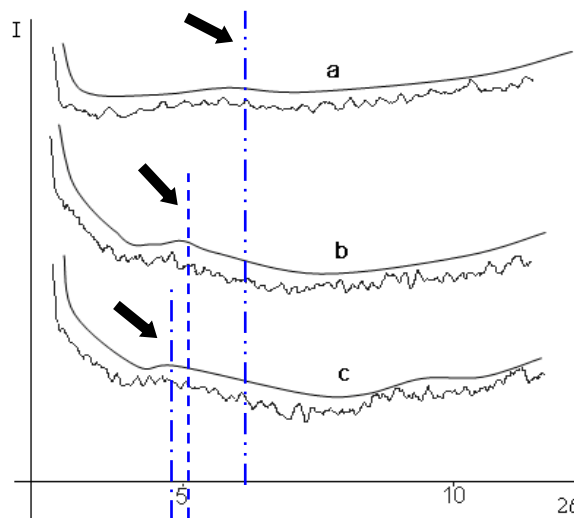


Gambar 1 Difraktogram lempung terpillar Al yang dikalsinasi pada 450°C dengan perbedaan rasio Al/Lempung. (a) 4, (b) 2, (c) 0,5.

Lempung terpillar yang diperoleh berbentuk serbuk berwarna coklat muda (sampel B, T 300°C) dan coklat kemerahan (sampel A, B dan C T = 450°C dan sampel B, T = 600°C). Berdasarkan Gambar 1 tidak terjadi pergeseran 2θ ( $d_{001} = 17,65$ ), yang menunjukkan bahwa ukuran *basal spacing* tidak dipengaruhi oleh konsentrasi larutan pemilarnya. Hal ini menandakan bahwa ukuran pilar oksida yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh konsentrasi larutan pemilar melainkan oleh jenis larutan pemilarnya.

Adanya peningkatan intensitas difraktogram dengan semakin besar rasio Al/lempung, menunjukkan kristalinitas lempung yang meningkat, yang memperlihatkan distribusi ukuran pori yang lebih sempit dengan pilar yang ukurannya seragam [3]. Hal ini disebabkan pada konsentrasi Al yang tinggi, peluang polikation aluminium untuk masuk ke daerah antar lapis semakin besar, di mana ion keggin menyesuaikan muatannya terhadap distribusi muatan di antar lapis, sehingga jumlah pilar yang terbentuk semakin banyak yang berakibat makin kuat atau stabilnya lempung terpillar tersebut [1]. Hal tersebut sesuai dengan yang dilaporkan Figueras [4] yang menyatakan bahwa konsentrasi mempengaruhi tingkat pertukaran dan distribusi kation di antar lapis lempung. Puncak-puncak yang sangat lebar yang diperlihatkan pada difraktogram menunjukkan adanya pori-pori yang besar yang ukurannya tidak seragam [3].

Pengaruh Variasi Suhu Kalsinasi



Gambar 2 Difraktogram sampel B dengan perbedaan temperatur kalsinasi. (a) 600°C, (b) 450°C, (c) 300°C

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui terjadi pergeseran 2θ ke kanan dengan peningkatan suhu kalsinasi yang menunjukkan penurunan *basal spacing*. Hal ini menandakan adanya perubahan ukuran pilar alumina oksida yang disebabkan oleh terjadinya dekomposisi pilar pada keadaan suhu yang semakin meningkat. Kemungkinan lain yakni terjadi kerusakan pilar alumina oksida akibat kenaikan suhu. Hal ini didukung oleh penelitian [6, 8] yang juga menghasilkan difraktogram yang menurun dengan kenaikan suhu yang menunjukkan bahwa pilar Al menurun dengan kenaikan suhu.

Difraktogram di atas juga memperlihatkan intensitas yang menurun dengan peningkatan suhu kalsinasi. Hal tersebut menunjukkan penurunan kristalinitas lempung terpillar yang menandakan distribusi pilar antar lapis semakin kecil. Fenomena di atas terjadi karena banyaknya pilar-pilar yang runtuh pada suhu yang tinggi.

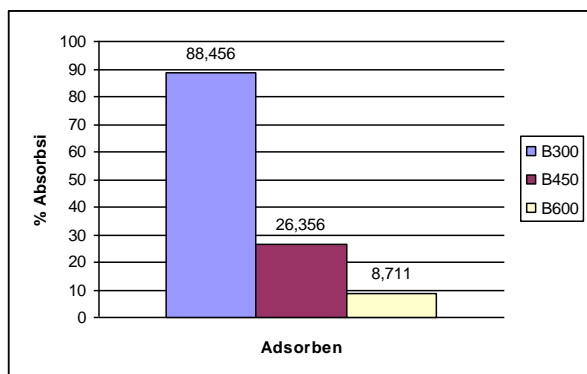
Tabel 1 *Basal spacing* lempung,  $d_{001}$  (Å) dengan variasi suhu kalsinasi.

T (°C)	$d_{001}$ (Å)
300	18,03
450	17,65
600	15,41

Uji Adsorpsi Lempung Terpillar terhadap Indigo Karmina

Untuk menentukan efektifitas adsorpsi dari lempung terpillar-Al yang dihasilkan, lempung tersebut digunakan untuk mengadsorpsi larutan indigo karmina. Hasil dari adsorpsi disajikan pada Gambar 3. dan Gambar 4.

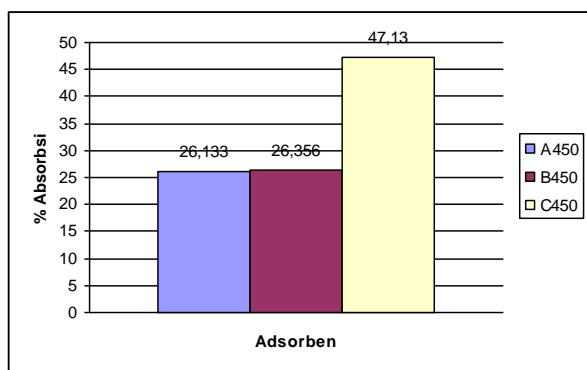




Gambar 3. Grafik absorpsi pewarna indigo karmina oleh lempung terpillar Al dengan perbedaan suhu kalsinasi.

Proses pengadsorpsian indigo karmina oleh lempung terpillar terjadi pada permukaan lempung terpillar yang sangat dipengaruhi oleh luas permukaan dan ukuran porinya. Semakin besar luas permukaan dan ukuran pori maka semakin besar kemampuan adsorpsinya.

Dari Gambar 4 diketahui bahwa sampel dengan perbedaan suhu kalsinasi, yang paling efektif mengadsorpsi yaitu sampel yang dikalsinasi pada suhu 300°C yang mencapai 88,45%. Hal ini terjadi karena lempung terpillar yang dikalsinasi pada suhu 300°C mempunyai ukuran *basal spacing* dan distribusi pilar yang lebih besar dibandingkan lempung terpillar yang dikalsinasi pada suhu 450°C dan 600°C. Dengan semakin besarnya distribusi pilar di antar lapis lempung terpillar menyebabkan lebih banyak indigo karmina yang dapat teradsorpsi oleh lempung. Lempung terpillar dengan kalsinasi pada suhu tinggi, terdapat pilar-pilar Al yang runtuh karena tidak stabil. Hal tersebut akan mengurangi pilar Al, sehingga indigo karmina yang teradsorpsi berkurang.



Gambar 4. Grafik absorpsi perwarna indigo karmina oleh lempung terpillar Al dengan perbedaan konsentrasi pemilar pada suhu 450°C. (A) 0,5, (B) 2, (C) 4

Dari Gambar 4 diketahui bahwa untuk lempung terpillar dengan perbedaan konsentrasi pemilar, yang paling efektif mengadsorpsi indigo karmina yaitu sampel C450, yang mempunyai rasio Al/lempung paling besar yakni 4 yang mencapai 47,13%. Hal ini terjadi karena pada lempung terpillar dengan rasio Al/lempung lebih besar, konsentrasi pemilar yang masuk lebih

banyak, sehingga dimungkinkan pilar  $Al_2O_3$  yang dihasilkan lebih banyak, hal ini akan menyebabkan indigo karmina lebih banyak teradsorpsi. Hal tersebut terjadi karena menurut Cool dan Vansant [5] adsorpsi adsorbat pada lempung terpillar Al merupakan interaksi antara molekul adsorbat dan spesies  $Al_2O_3$ .

#### 4. Kesimpulan

Sintesis lempung terpillar Al menggunakan pemilar polikation aluminium telah membentuk lempung terpillar  $Al_2O_3$ . Semakin besar suhu kalsinasi, maka *basal spacing* dan kristalinitas yang dihasilkan semakin rendah. Rasio Al/lempung tidak mempengaruhi *basal spacing* tetapi mempertinggi kristalinitasnya. Lempung terpillar Al dapat digunakan sebagai adsorben indigo karmina

#### 5. Daftar Pustaka

- [1] Thomas J. Pinnavaia, *Intercalated Clay Catalysts, Science*, 220, 4595, (1983) 365-371 [10.1126/science.220.4595.365](https://doi.org/10.1126/science.220.4595.365)
- [2] Kim Howard Tan, *Principles of Soil Chemistry*, M. Dekker, 1993.
- [3] N. Maes, I. Heylen, P. Cool, E. F. Vansant, The relation between the synthesis of pillared clays and their resulting porosity, *Applied Clay Science*, 12, 1, (1997) 43-60 [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(96\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(96)00036-1)
- [4] F. Figueras, Pillared Clays as Catalysts, *Catalysis Reviews*, 30, 3, (1988) 457-499 [10.1080/01614948808080811](https://doi.org/10.1080/01614948808080811)
- [5] P. Cool, E. F. Vansant, Pillared Clays: Preparation, Characterization and Applications, in: *Synthesis*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1998, pp. 265-288.
- [6] M. J. Hernando, C. Pesquera, C. Blanco, I. Benito, F. González, Differences in Structural, Textural, and Catalytic Properties of Montmorillonite Pillared with  $(GaAl)_2$  and  $(AlAl)_2$  Polyoxocations, *Chemistry of Materials*, 8, 1, (1996) 76-82 [10.1021/cm950225m](https://doi.org/10.1021/cm950225m)
- [7] Kunio Ohtsuka, Preparation and Properties of Two-Dimensional Microporous Pillared Interlayered Solids, *Chemistry of Materials*, 9, 10, (1997) 2039-2050 [10.1021/cm9605227](https://doi.org/10.1021/cm9605227)
- [8] S. Moreno, E. Gutierrez, A. Alvarez, N. G. Papayannakos, G. Poncelet, Al-pillared clays: from lab syntheses to pilot scale production characterisation and catalytic properties, *Applied Catalysis A: General*, 165, 1, (1997) 103-114 [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(97\)00194-4](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(97)00194-4)