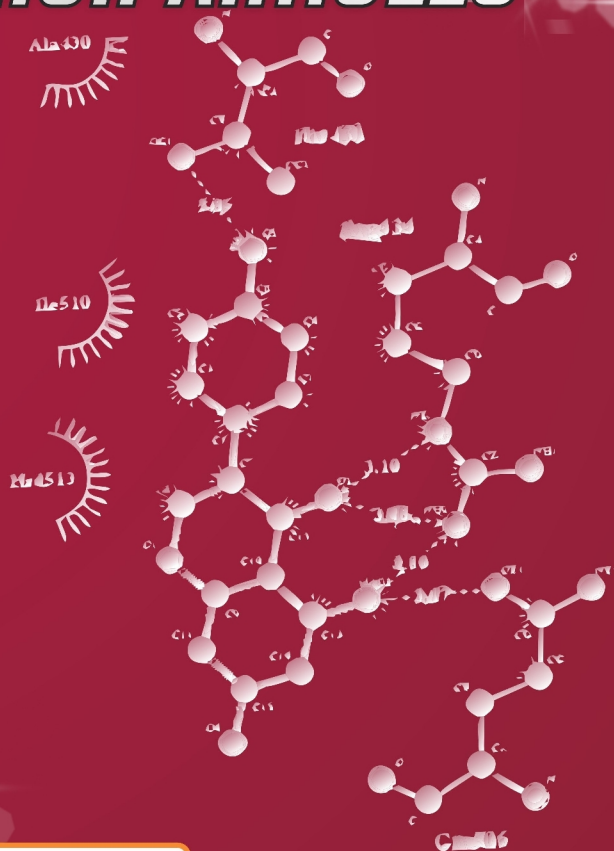




ISSN: 2614-8757 (Print)
2615-2347 (Online)

CHEESA

*CHEMICAL ENGINEERING
RESEARCH ARTICLES*



VOLUME 3 NO 2, DESEMBER 2020

DAFTAR ISI

CHEESA: Chemical Engineering Research Articles

- Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas**
Zaldy Rusli, Lusi Agus Setiani
..... 55-62
- Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum*) Secara Hidrodistilasi**
Shintawati, Analiasari, Zukryandry
..... 63-70
- Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa L.*) Menggunakan Tray Dryer**
Rintis Manfaati, Hibah Baskoro, Muhammad Muhlis Rifai
..... 71-78
- Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker**
Ersalina Nidianti, Ary Andini, Nia Kurniaty Rukman
..... 79-87
- Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS**
Fatimah, Rahma Diyan Martha, Asmarani Kusumawati
..... 88-98
- Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)**
Meilisa Rusdiana Surya Efendi, Sri Sumarsih, Novia Fajarwati
..... 99-105

Volume 3 Nomor 2, 2020

ISSN 2614-8757 (Print), ISSN 2615-2347 (Online)

Available online at: <http://e-journal.unipma.ac.id/index.php/cheesa>

Copyright © 2020

EDITORIAL BOARD

CHEESA: Chemical Engineering Research Articles

CHEESA merupakan jurnal yang menjadi media kajian kimia dan teknik kimia. Jurnal ini sebagai media publikasi hasil penelitian bidang kimia dan teknik kimia yang ditujukan untuk kalangan akademisi, praktisi dan masyarakat pada umumnya. Tulisan yang dimuat dalam Jurnal CHEESA telah melalui penyuntingan sesuai kaidah yang telah ditetapkan tanpa mengubah naskah asli.

Penerbit

UNIVERSITAS PGRI MADIUN

Editor in Chief

Mohammad Arfi Setiawan, Universitas PGRI Madiun

Associate (Handling) Editors

Khoirul Ngibad (SCOPUS ID: 57200993235), Universitas Maarif Hasyim Latif

Dyan Hatining Ayu Sudarni (SCOPUS ID: 57213418313), Universitas PGRI Madiun

Andri Wahyu Wijayadi, Universitas Hasyim Asy'ari

Ade Trisnawati, Universitas PGRI Madiun

Editorial Advisory Board

Salfauqi Nurman (SCOPUS ID: 57193575828), Universitas Serambi Mekkah

Rokiy Alfanaar (SCOPUS ID: 57202806877), Universitas Ma Chung

Wahyu Prasetyo Utomo (SCOPUS ID: 57114966400), Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Said Ali Akbar (SCOPUS ID: 57190374979), Universitas Serambi Mekkah

Viona Natalia (SCOPUS ID: 57205220032), Universitas Sebelas Maret

Reviewer

Prof. Dr. Yandi Syukri (SCOPUS ID: 57190751925), Universitas Islam Indonesia

Dr. Joko Waluyo (SCOPUS ID: 37114996900), Universitas Sebelas Maret

Dr.-Ing. Anton Irawan (SCOPUS ID: 9637080100), Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

Mochamad Zakki Fahmi, Ph.D (SCOPUS ID: 55266590600), Universitas Airlangga

Dr. rer. nat. Deni Rahmat (SCOPUS ID: 36673726800), Universitas Pancasila

Agus Haryanto, Ph.D (SCOPUS ID: 56237082700), Universitas Lampung

Dr. Dian Kresnadipayana (SCOPUS ID: 57193447828), Universitas Setia Budi

Dr. Heri Septya Kusuma (SCOPUS ID: 57188879331), Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Dr. Agus Muji Santoso, Universitas Nusantara PGRI Kediri

Rahmat Basuki, (SCOPUS ID: 57192273631), Universitas Pertahanan

Ayu Ratna Permanasari (SCOPUS ID: 57195406707), Politeknik Negeri Bandung

Felix Arie Setiawan (SCOPUS ID: 57210575126), Universitas Jember

Iman Mukhaimin (SCOPUS ID: 57201342240), Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang

Cucuk Evi Lusiani (SCOPUS ID: 57202970560), Politeknik Negeri Malang

Vibianti Dwi Pratiwi, Institut Teknologi Nasional Bandung

Sri Budi Harmami (SCOPUS ID: 36161175400), Pusat Penelitian Kimia-LIPI

Nove Kartika Erliyanti (SCOPUS ID: 57208578104), UPN Veteran Jawa Timur

Yazida Rizkayanti (SCOPUS ID: 57205611542), Universitas Gadjah Mada

Volume 3 Nomor 2, 2020

ISSN 2614-8757 (Print), ISSN 2615-2347 (Online)

Available online at: <http://e-journal.unipma.ac.id/index.php/cheesa>

Copyright © 2020

Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas

Modification of the Inhibitory Concentration Analysis Method of the Heat-Induced Protein Denaturation Process

Zaldy Rusli^{1*)}, Lusi Agus Setiani¹⁾

¹⁾Universitas Pakuan, Program Studi Farmasi, Indonesia

*email penulis: zaldy.rusli@unpak.ac.id

Received: 20/09/20; Revised: 20/10/20; Accepted: 20/10/20

Abstrak

Sebagian besar protein akan mengalami denaturasi yang lambat pada suhu tubuh, dapat terjadi dalam waktu setengah hari atau bahkan tahun. Proses denaturasi protein dapat diinduksi oleh panas sehingga akan terjadi perubahan struktur dari protein dan mengakibatkan perubahan peran biologis dari protein tersebut yang dapat berdampak bagi kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari metode yang dimodifikasi untuk digunakan dalam menganalisis daya hambat suatu bahan terhadap proses denaturasi protein yang diinduksi oleh panas. Metode yang digunakan adalah metode analisis penghambatan proses denaturasi protein secara *in vitro*. Protein dikondisikan pada suhu tubuh (37 °C) yang dilanjutkan dengan menginduksi protein menggunakan panas pada suhu 70 °C. Modifikasi dilakukan dengan menambahkan suatu kontrol tanpa perlakuan, reagen uji protein serta persamaan yang digunakan untuk menentukan konsentrasi penghambatan denaturasi 50% protein (IC50). Analisis dilakukan dengan mengukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa konsentrasi dari natrium diklofenak dan ekstrak air daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dengan menggunakan parameter IC50 diperoleh hasil berturut-turut adalah 520,80 mg/L dan 3.751,88 mg/L. Metode ini dapat digunakan untuk menentukan daya hambat proses denaturasi protein, tetapi masih memerlukan pengembangan lebih lanjut, agar diperoleh suatu metode yang memiliki tingkat akurasi dan presisi yang baik.

Kata kunci: daun Afrika; daya hambat; denaturasi protein; induksi panas; modifikasi metode; natrium diklofenak

Abstract

*Most proteins denature slowly at body temperature, which can occur within half a day or even years, but the process of protein denaturation can be induced by heat so that there will be a change in the structure of the protein and it can cause many biological consequence. This research aims to study a modified method used in analyzing the inhibition of a material against the protein denaturation process heat-induced. The method used was the analysis of the inhibits of protein denaturation process by *in vitro*. Protein is conditioned at body temperature (37 °C) followed by heat-induced at 70 °C. Modification is done by adding a control without treatment, protein test reagent and the equation to determine the inhibitory concentration 50% protein denaturation (IC50). The analysis was carried out by measuring the absorption using a UV-Vis spectrophotometer. The results showed that the concentration of diclofenac sodium and the water extract of African leaves (*Vernonia amygdalina*) using the IC50 parameter and the results were 520.80 mg/L and 3,751.88 mg/L. This method can be used, however, further testing and development is still needed, in order to obtain a method that has a good accuracy and precision.*

Keywords: African leaves; heat-induced; inhibition concentration; modification method; protein denaturation; sodium diclofenac

PENDAHULUAN

Setiap sel pada manusia mengandung ribuan protein berbeda, yang menjalankan berbagai fungsi biologis. Fungsi biologis dari protein dihasilkan ketika protein berada pada keadaan alaminya. Kondisi ketika protein mengalami perubahan kimia maupun biologis disebut dengan istilah denaturasi. Protein memiliki berat molekul sekitar lima ribu hingga satu juta, sehingga protein sangat mudah mengalami denaturasi (Aryadnyani *dkk.*, 2020).

Salah satu penyebab denaturasi protein adalah suhu. Sebagian besar protein mengalami denaturasi yang lambat pada suhu tubuh yang dapat terjadi dalam waktu setengah hari atau bahkan tahunan. Denaturasi protein dapat menyebabkan gangguan biologis seperti penyakit genetik dan kanker mutasi somatik (Fersht, 2013).

Berbagai bahan, baik bahan kimia obat maupun bahan alam, telah diteliti dan dikembangkan untuk menghambat terjadinya denaturasi protein. Bahan kimia obat yang diketahui memiliki daya hambat yang tergantung kepada dosis antara lain indometasin dan fenilbutazon (Saso *dkk.*, 1999), serta banyak peneliti yang melaporkan bahwa natrium diklofenak juga memiliki daya hambat terjadinya denaturasi protein. Bahan alam seperti daun afrika (*Vernonia amygdalina*) diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap terjadinya denaturasi protein (Alara *dkk.*, 2017).

Metode pengujian daya hambat denaturasi protein secara *in vitro* yang ada saat ini dan telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian adalah mengukur tingkat kekeruhan hasil denaturasi protein yang diinduksi oleh panas menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (Bailey-shaw *dkk.*, 2017; Chandra *dkk.*, 2012; Heendeniya *dkk.*, 2018; Mahendran *dkk.*, 2015; Quasie

dkk., 2016). Namun, terdapat perbedaan persamaan yang digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Mahendran *dkk.* (2015) dibandingkan yang lain, sehingga menyebabkan bias dari metode tersebut. Metode tersebut juga mengasumsikan semua protein (100%) mengalami denaturasi (Anyasor *dkk.*, 2019). Hal ini bertentangan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Nikolaidis & Moschakis, 2017).

Hal tersebut yang menjadi dasar dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari metode yang dimodifikasi untuk digunakan dalam menganalisis daya hambat suatu bahan obat maupun bahan alam terhadap proses denaturasi protein yang disebabkan oleh panas. Penelitian ini dilakukan dengan modifikasi metode yang telah ada, terutama dengan adanya parameter kelompok kontrol tanpa perlakuan dan parameter kontrol negatif (kelompok dengan perlakuan), sehingga dapat diperoleh laju penghambatan yang terukur.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Farmasi, Program Studi Farmasi, Universitas Pakuan Bogor. Alat yang digunakan meliputi spektrofotometer UV-Vis Genesys, oven dan alat gelas laboratorium. Bahan yang digunakan meliputi daun afrika, natrium diklofenak, Tembaga sulfat, Kalium Natrium tartrat, natrium hidroksida, natrium klorida, kalium klorida, dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, bovine serum albumin (BSA), metanol, akuadest.

Pembuatan Larutan Induk

Penetapan daya hambat dimulai dengan pembuatan larutan buffer fosfat pH

Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas

7,4, pembuatan larutan BSA 0,6%, pembuatan larutan biuret, pembuatan larutan natrium diklofenak dan ekstrak air daun afrika, kemudian analisis daya hambat. Larutan buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan cara melarutkan 8 gram NaCl, 200 mg KCl, 1,44 gram Na₂HPO₄ dan 245 mg KH₂PO₄ dalam 800 mL akuadest. Setelah larut, pH diukur dan ditepatkan hingga pH 7,4 menggunakan asam fosfat atau NaOH. Larutan BSA 0,6% dibuat dengan cara menimbang 0,6 gram BSA dan dilarutkan dalam 100 mL akuabidest. Larutan biuret dibuat dengan cara menimbang sebanyak 1,5 gram CuSO₄, 6 gram Kalium Natrium tartrat, dicampurkan dengan NaOH 2N sebanyak 375 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur volume 1 L, lalu ditambahkan akuadest hingga tanda batas.

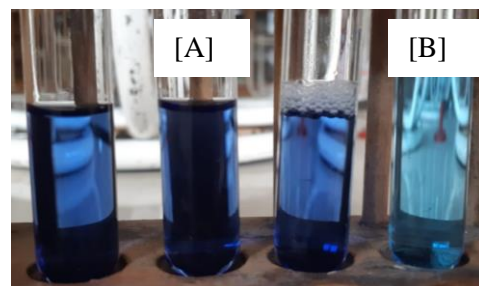
Larutan induk natrium diklofenak dibuat dengan cara menimbang 500 mg standar natrium diklofenak dan dilarutkan dengan 10 mL metanol dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan menggunakan akuadest sampai batas, sehingga diperoleh larutan induk natrium diklofenak dengan konsentrasi 5.000 mg/L. Sedangkan larutan ekstrak air daun afrika dibuat dengan cara menimbang 12 gram simplisia daun afrika, kemudian direbus dalam 100 mL aquabidest pada suhu 90 °C selama 15 menit. Setelah didinginkan ekstrak disaring dan ditepatkan hingga 100 mL menggunakan akuabidest, sehingga diperoleh larutan ekstrak dengan konsentrasi 120.000 mg/L.

Analisis Daya hambat

Analisis daya hambat dilakukan dengan cara mengukur serapan dari larutan uji kontrol positif (tanpa pelakuan pemanasan), kontrol negatif (dengan perlakuan pemanasan), deret larutan natrium diklofenak dan ekstrak air daun

afrika. Larutan kontrol positif dibuat dengan cara mencampurkan 1,5 mL larutan BSA 0,6%, 1,5 mL larutan buffer fosfat pH 7,4 dan 3 mL biuret dengan pengulangan 3x. Serapan campuran tersebut dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm.

Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan 1,5 mL larutan BSA 0,6%, 1,5 mL larutan buffer fosfat pH 7,4 dan 3 mL biuret dengan pengulangan 3x. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada 37 °C selama 30 menit, lalu dipanaskan pada suhu 70 °C selama 10 menit. Setelah didinginkan, dilakukan pengukuran serapan larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Larutan kontrol positif dan kontrol negatif dapat dilihat pada Gambar 1.

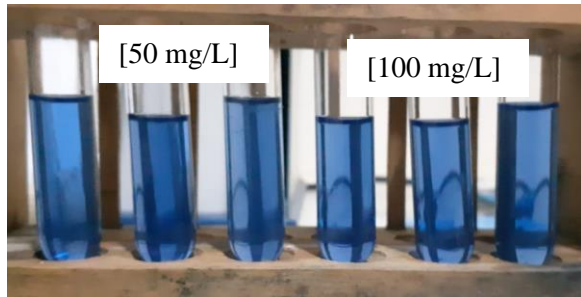


Gambar 1. [A] Larutan Kontrol Positif, [B] Larutan Kontrol Negatif

Larutan uji natrium diklofenak dibuat secara seri dengan memipet 0,06; 0,12; 0,36; 0,6 dan 1,2 mL larutan uji 5.000 mg/L ke dalam 5 buah tabung reaksi, lalu larutan dalam masing-masing tabung diencerkan menggunakan larutan buffer fosfat pH 7,4 hingga 1,5 mL. Ke dalam masing-masing tabung, ditambahkan 1,5 mL larutan BSA 0,6% dan 3 mL biuret. Campuran ini menghasilkan deret dengan konsentrasi 50, 100, 300, 500, 1000 mg/L dengan pengulangan 3x. Masing-masing konsentrasi dipanaskan pada 37 °C selama

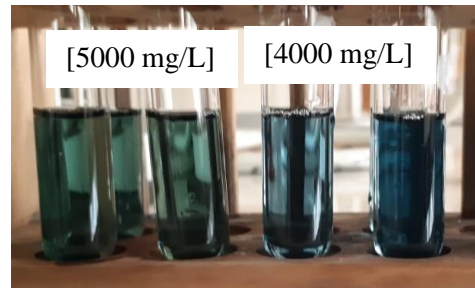
Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas

30 menit, lalu dipanaskan pada suhu 70 °C selama 10 menit. Setelah didinginkan, serapan masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Larutan uji diklofenak dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Larutan Uji Natrium Diklofenak 50 mg/L dan 100 mg/L

Larutan uji ekstrak air daun afrika dibuat seri larutan uji dengan memipet 0,05; 0,1; 0,2 dan 0,25 mL larutan induk 120.000 mg/L ke dalam 4 buah tabung reaksi, lalu larutan dalam masing-masing tabung diencerkan hingga 1,5 mL menggunakan larutan buffer fosfat pH 7,4. Ke dalam masing-masing tabung, ditambahkan 1,5 mL larutan BSA 0,6% dan 3 mL biuret. Campuran ini menghasilkan deret dengan konsentrasi 1000, 2000, 4000, 5000 mg/L dengan pengulangan 3x. Masing-masing konsentrasi dipanaskan pada 37 °C selama 30 menit, lalu dipanaskan pada suhu 70 °C selama 10 menit. Setelah didinginkan, serapan masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Larutan uji diklorofenak dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Larutan Uji Ekstrak Daun Afrika 5000 mg/L, 4000 mg/L dan 3000 mg/L

Absorbansi yang diperoleh dirata-rata dan digunakan untuk menghitung daya hambat terhadap proses denaturasi protein menggunakan persamaan (1).

$$\text{Daya hambat (IC)} = \frac{A_{\text{uji}} - A_{\text{kontrol negatif}}}{A_{\text{kontrol positif}} - A_{\text{kontrol negatif}}} \times 100\% \dots (1)$$

Keterangan :

A_{uji} = Serapan masing-masing deret larutan uji natrium diklofenak dan ekstrak air daun afrika

$A_{\text{kontrol negatif}}$ = Serapan larutan kontrol negatif

$A_{\text{kontrol positif}}$ = Serapan larutan kontrol positif

Selanjutnya digambarkan grafik hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dengan daya hambat (sumbu y), lalu ditentukan persamaan regresi liniernya. Persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung konsentrasi yang dapat menghambat terdenaturasinya 50% protein (IC50) dengan menggunakan persamaan (2).

$$\text{IC50 (x)} = \frac{50 (y) - \text{intercept (a)}}{\text{slope (b)}} \dots (2)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan studi awal dalam memperoleh suatu metode *in vitro* yang dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan suatu bahan, baik bahan kimia maupun bahan alam, dalam menghambat terdenaturasinya protein. Pengujian daya hambatdenaturasi protein dilakukan menggunakan metode uji penghambatan denaturasi protein yang dilakukan oleh Chandra *dkk.* (2012), metode ini digunakan

Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas

secara umum untuk menganalisis kemampuan penghambatan denaturasi protein.

Perbedaan modifikasi metode dan metode sebelumnya terletak pada persamaan yang digunakan. Persamaan yang digunakan pada penelitian sebelumnya adalah

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(\frac{V_t}{V_c} - 1 \right) \quad \dots(3)$$

V_t = absorbansi larutan uji

V_c = absorbansi larutan kontrol

Persamaan (3) dapat diturunkan lebih lanjut, menjadi persamaan (4).

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \left(\frac{V_t - V_c}{V_c} \right) \quad \dots(4)$$

Persamaan (4) menggunakan asumsi jumlah protein terdegradasi adalah 100%, sehingga tidak dapat menggambarkan jumlah protein yang terdenaturasi maupun yang tidak mengalami denaturasi. Jumlah protein terdenaturasi dapat diperoleh dengan cara menghitung selisih antara jumlah protein awal (tanpa perlakuan induksi panas) dengan jumlah protein akhir setelah diinduksi oleh panas. Persamaan (1) diperoleh dari penurunan Persamaan (4) dengan menggunakan jumlah protein yang terdenaturasi sebagai pembanding.

Prinsip pembacaan pada metode sebelumnya adalah berdasarkan kekeruhan, hal ini dapat mempengaruhi pengamatan. Menurut Guo *dkk.* (2012) protein yang mengalami denaturasi akan terurai (*unfolding*) dan jika didinginkan maka protein tersebut dapat kembali ke bentuk semula (*folding*). Penggunaan reagen biuret dimaksudkan agar dapat membedakan antara protein yang terdenaturasi dan yang tidak terdenaturasi. Reagen ini dapat berikatan dengan protein pada ikatan peptida dan dapat bekerja dalam range yang lebar, yaitu 0,1 – 0,5 g/L (Bianchi-Bosisio,

2005). Untuk dapat mengetahui jumlah protein yang terdenaturasi, maka jumlah protein mula-mula sebaiknya tinggi (Schön *dkk.*, 2017), sehingga masih ada sisa protein dalam jumlah yang cukup setelah mengalami denaturasi.

Hasil pengukuran absorbansi deret larutan uji natrium diklofenak dapat dilihat pada Tabel 1. Plot antara konsentrasi dan daya hambat diperoleh nilai *intercept* sebesar -3,7111, *slope* sebesar 0,1031 dan R^2 sebesar 0,9994 yang dapat dilihat pada Gambar 4. Nilai IC50 diperoleh dari persamaan (2). Dengan menggunakan metode yang telah dimodifikasi, diketahui bahwa daya hambat 50% protein yang terdenaturasi (IC50) dari natrium diklofenak adalah sebesar 520,80 mg/L. Daya hambat ini disebabkan oleh kemampuan natrium diklofenak dalam berikatan dengan albumin (Hossain *dkk.*, 2016) dan membuat protein lebih stabil, sehingga ketika diinduksi oleh panas, protein tidak mengalami denaturasi. Obat-obat golongan *Non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) seperti natrium diklofenak telah terbukti mengikat serum albumin pada residu triptofan (Czub *dkk.*, 2020).

Metode ini juga dapat digunakan untuk mengukur daya hambat dari ekstrak bahan alam. Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak air daun afrika. Hasil pengukuran daya hambat terhadap denaturasi protein oleh daun afrika dapat dilihat pada Tabel 1. Plot antara konsentrasi dan daya hambat diperoleh nilai *intercept* sebesar -12,1162, *slope* sebesar 0,0166 dan R^2 sebesar 0,9726 yang dapat dilihat pada Gambar 5. Nilai IC50 diperoleh dari persamaan 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air daun afrika memiliki daya hambat 50% denaturasi protein (IC50) pada konsentrasi 3.751,88 mg/L. Aktivitas

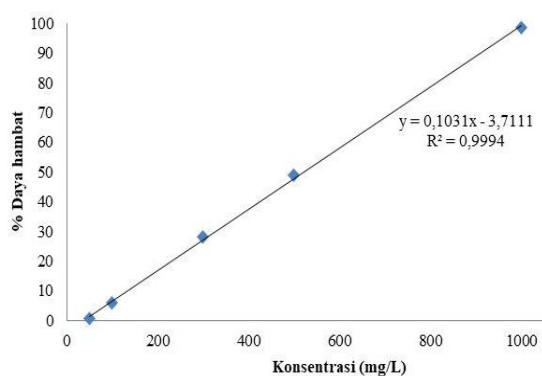
Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas

penghambatan ini disebabkan oleh adanya metabolisme sekunder seperti senyawa flavonoid (Kumar *dkk.*, 2011) yang berikatan dengan albumin dan membuat protein lebih stabil, sehingga ketika diinduksi oleh panas, protein tidak

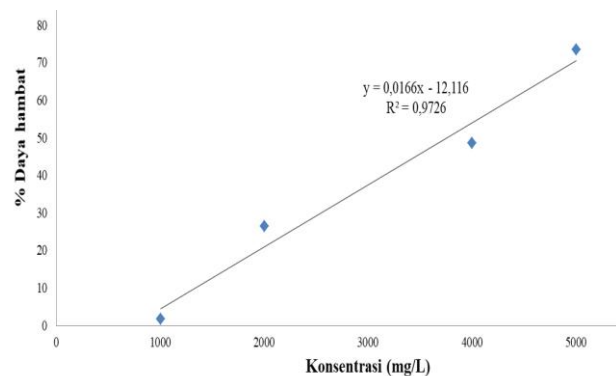
mengalami denaturasi. Hal ini disebabkan adanya interaksi antara gugus hidroksil dan cincin aromatik senyawa flavonoid dengan residu asam amino dalam rantai protein (Zinellu *dkk.*, 2015).

Tabel 1. Daya Hambat Larutan Natrium Diklofenak dan Ekstrak Air Daun Afrika

Larutan Uji	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi	Daya Hambat (%)	IC50 (mg/L)
Natrium Diklofenak	Kontrol (+)	0,313		
	Kontrol (-)	0,263		
	50	0,264	0,67	
	100	0,266	6,04	
	300	0,277	28,19	520,80
	500	0,288	48,99	
	1000	0,312	98,66	
Ekstrak Air Daun Afrika	Kontrol (+)	0,206		
	Kontrol (-)	0,125		
	1000	0,127	1,66	
	2000	0,147	26,56	3.751,88
	4000	0,164	48,55	
	5000	0,184	73,44	

**Gambar 4.** Grafik Hubungan Konsentrasi dan Daya Hambat dari Natrium Diklofenak

Metode ini masih memerlukan studi dan pengembangan lebih lanjut, terutama untuk mengetahui mekanisme penghambatan terjadinya denaturasi protein. Metode ini juga masih memerlukan verifikasi lebih lanjut agar metode ini

**Gambar 5.** Grafik Hubungan Konsentrasi dan Daya Hambat dari Ekstrak Air Daun Afrika

memiliki tingkat akurasi dan presisi yang baik. Metode ini juga perlu dilakukan pengujian menggunakan serum albumin pada manusia.

KESIMPULAN

Metode yang telah dimodifikasi ini dapat digunakan dalam menentukan daya hambat senyawa obat maupun bahan alam. Konsentrasi yang dapat menghambat terdenaturasinya 50% protein (IC50) dari natrium diklofenak menggunakan metode ini adalah 520,80 mg/L dan ekstrak air daun afrika adalah 3.751,88 mg/L. Metode ini masih memerlukan pengembangan lebih lanjut, agar diperoleh suatu metode yang memiliki tingkat akurasi dan presisi yang baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Deputi Bidang Penguatan Riset dan Pengembangan KEMENRISTEK/BRIN melalui hibah Penelitian Dosen Pemula Perguruan Tinggi 2020.

DAFTAR RUJUKAN

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Mudalip, S. K. A., & Olalere, O. A. (2017). PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF *Vernonia amygdalina*: A REVIEW. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*, 2, 80–96. <https://doi.org/10.15282/jceib.v2i1.3871>

Anyasor, G. N., Okanlawon, A. A., & Ogunbiyi, B. (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0137-8>

Aryadnyani, N. P., Chairlan, & Inderiati, D. (2020). Pengaruh Suhu dan Waktu Pemanasan Terhadap Ketahanan Telur *Ascaris lumbricoides*. *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 8(6), 40–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.3399>

2/m.v8i1.1113

Bailey-shaw, Y. A., Williams, L. A. D., Green, C. E., Rodney, S., & Smith, A. M. (2017). In-Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential of Selected Jamaican Plant Extracts using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 47(1), 145–153.

Bianchi-Bosisio, A. (2005). PROTEINS | Physiological Samples. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. B. T.-E. of A. S. (Second E. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 357–375). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00494-5>

Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178–S180. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60154-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60154-3)

Czub, M. P., Handing, K. B., Venkataramany, B. S., Cooper, D. R., Shabalin, I. G., & Minor, W. (2020). Albumin-Based Transport of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Mammalian Blood Plasma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(13), 6847–6862. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00225>

Fersht, A. R. (2013). Denaturation (Proteins). In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00393-4>

Guo, M., Xu, Y., & Gruebele, M. (2012). Temperature dependence of protein folding kinetics in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), 17863–17867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201797109>

- Heendeniya, S. N., Ratnasooriya, W. D., & Pathirana, R. N. (2018). In vitro investigation of anti-inflammatory activity and evaluation of phytochemical profile of *Syzygium caryophyllatum*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 1759–1763. <http://www.phytojournal.com/archive/s/2018/vol7issue1/PartX/7-1-93-533.pdf>
- Hossain, M. K., Khatun, A., Rahman, M., Akter, M. N., Chowdhury, S. A., & Alam, S. M. (2016). Characterization of the Effect of Drug-Drug Interaction on Protein Binding in Concurrent Administration of Sulfamethoxazol and Diclofenac Sodium Using Bovine Serum Albumin. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(4), 589–595. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.073>
- Kumar, A., Ghosh, S., & Vaishali. (2011). An experimental evaluation of *Ageratum conyzoides* on membrane stabilization and protein denaturation during acute inflammation and arthritis. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 4(2), 313–317. <https://doi.org/10.13005/bpj/302>
- Mahendran, G., Manoj, M., Rajendra Prasad, K. J., & Narmatha Bai, V. (2015). Antioxidants, anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-microbial effects of isolated compounds from *Swertia corymbosa* (Grieb.)Wight ex C.B. Clark – An in vitro approach. *Food Science and Human Wellness*, 4(4), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.08.003>
- Nikolaidis, A., & Moschakis, T. (2017). Studying the denaturation of bovine serum albumin by a novel approach of difference-UV analysis. *Food Chemistry*, 215(August), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.133>
- Quasie, O., Zhang, Y. M., Zhang, H. J., Luo, J., & Kong, L. Y. (2016). Four new steroid saponins with highly oxidized side chains from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Phytochemistry Letters*, 15, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.11.002>
- Saso, L., Valentini, G., Casini, M. L., Mattei, E., Braghiroli, L., Mazzanti, G., Panzironi, C., Grippa, E., & Silvestrini, B. (1999). Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: A new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases. *Japanese Journal of Pharmacology*, 79(1), 89–99. <https://doi.org/10.1254/jjp.79.89>
- Schön, A., Clarkson, B. R., Jaime, M., & Freire, E. (2017). Temperature stability of proteins: Analysis of irreversible denaturation using isothermal calorimetry. *Proteins*, 85(11), 2009–2016. <https://doi.org/10.1002/prot.25354>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Forteschi, M., Giordo, R., Cossu, A., Posadino, A. M., Carru, C., & Pintus, G. (2015). Human Serum Albumin Increases the Stability of Green Tea Catechins in Aqueous Physiological Conditions. *PLOS ONE*, 10(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134690>

Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum*) Secara Hidrodistilasi

Kinetics of Black Pepper (Piper nigrum) Essential Oil Extraction by Hydrodistillation

Shintawati^{1a*)}, Analiasari^{1b)}, Zukryandry^{1c)}

^{1a)}Politeknik Negeri Lampung, Teknologi Rekayasa Kimia Industri, Indonesia

^{1b)}Politeknik Negeri Lampung, Pengembangan Produk Agroindustri, Indonesia

^{1c)}Politeknik Negeri Lampung, Teknologi Pangan, Indonesia .

*email: shintawati@polinela.ac.id

Received: 01/09/20; Revised: 24/10/20; Accepted: 08/11/20

Abstrak

Lada hitam dikenal dengan nama *King of Spices* yang merupakan salah satu komoditi unggulan ekspor asal Provinsi Lampung. Lada hitam memiliki aroma dan rasa pedas yang khas. Kontribusi aroma berasal dari senyawa *volatile* yang terkandung pada minyak atsiri dalam lada hitam. Minyak atsiri lada diperoleh dari ekstraksi pelarut, hidrodistilasi, distilasi uap, distilasi fluida super kritis dan hidrodistilasi menggunakan *microwave*. Nilai konsentrasi minyak atsiri selama ekstraksi serta laju ekstraksi dapat diprediksi dari model kinetika. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari ekstraksi minyak atsiri lada hitam dan mengetahui model kinetika ekstraksi minyak atsiri lada hitam secara hidrodistilasi. Hidrodistilasi dilaksanakan selama 5 jam dengan pengambilan data setiap 15 menit. Hasil penelitian memperlihatkan kinetika ekstraksi lada hitam mengikuti model kinetika ekstraksi orde dua. Nilai parameter kinetika orde dua dari ekstraksi minyak atsiri lada hitam yaitu kapasitas ekstraksi minyak atsiri lada, C_s , laju awal ekstraksi, h , dan konstanta laju ekstraksi, k masing-masing adalah $4,9 \text{ gL}^{-1}$, $0,206 \text{ g L}^{-1}\text{menit}^{-1}$ dan $0,0086 \text{ g}^{-1}\text{L menit}^{-1}$ dan nilai determinasi sebesar 99,97%. Hasil eksperimen didapat perolehan ekstraksi sebesar 5,14%.

Kata kunci: ekstraksi; hidrodistilasi; kinetika; lada hitam; orde dua

Abstract

Black pepper known as the King of Spices is one of the leading export commodities from Lampung Province. Black pepper has a distinctive spicy aroma and taste. The aroma contribution comes from the volatile compounds contained in the essential oil of black pepper. Black pepper essential oil is obtained from solvent extraction, hydrodistillation, steam distillation, super critical fluid distillation and hydrodistillation using a microwave. The value of essential oil concentration during extraction and the extraction rate can be predicted from the kinetics model. The purpose of this research was to study the extraction of black pepper essential oil and to know the kinetics model of black pepper essential oil extraction by hydro distillation. Hydro distillation was carried out for 5 hours with data collection every 15 minutes. The results showed that the black pepper extraction kinetics followed the second order kinetics model. The second order kinetics parameter values of black pepper essential oil extraction were the extraction capacity of pepper essential oil, C_s , initial extraction rate, h , and extraction rate constant, k respectively. 4.9 g L^{-1} , $0.206 \text{ g L}^{-1}\text{minute}^{-1}$ and $0.0086 \text{ g}^{-1}\text{L minute}^{-1}$ and a determination value of 99.97%. The experimental yield extraction is 5.14%.

Keywords: black pepper; extraction; hydrodistillation; kinetic; second order

PENDAHULUAN

Lada hitam merupakan buah dari tanaman *Piper nigrum* yang telah dikeringkan yang memiliki rasa dan aroma yang khas. Lada hitam digunakan sebagai bahan pangan rempah, dan mengandung bioaktif yang memiliki manfaat bagi kesehatan antara lain meningkatkan kemampuan cerna terhadap makanan, untuk pengobatan batuk, memperbaiki permasalahan pernafasan, masalah otot jantung, diabetes, anemia serta berpotensi sebagai sediaan obat herbal analgesik, anti-inflamasi, antipiretik (Mohammed, 2016).

Minyak atsiri merupakan minyak yang mudah menguap pada tanaman, dan memiliki bau yang khas (Maharaj & McGaw, 2020) dan dapat dikatakan sebagai “*flavor fingerprint*” pada rempah-rempah (Ruth *dkk.*, 2019). Minyak atsiri lada merupakan campuran senyawa-senyawa mudah menguap yang diperoleh dari distilasi biji lada kering. Minyak atsiri lada hitam mampu meringankan infeksi pernafasan (Kumoro *dkk.*, 2010), meredakan ketegangan otot (Tran *dkk.*, 2019) dan memiliki aktifitas antibakteri serta antijamur (Martinelli *dkk.*, 2017).

Metode ekstraksi minyak atsiri dari tanaman telah banyak dikembangkan antara lain hidrodistilasi, distilasi uap, *microwave* hidrodistilasi dan ekstraksi *supercritical carbon dioxide* (Kumoro *dkk.*, 2010; Maharaj & McGaw, 2020). Distilasi merupakan proses pemisahan komponen dalam hal ini minyak atsiri dari campurannya berdasarkan perbedaan titik didih (Nisa & Aminudin, 2019). Metode hidrodistilasi memiliki keunggulan yaitu proses operasional relatif sederhana, biaya pelarut yang rendah, aman bagi lingkungan dan biaya modal yang rendah (Tran *dkk.*, 2019).

Kajian kinetika ekstraksi minyak atsiri dari tanaman telah banyak dilakukan. Maharaj & McGaw (2020) mengkaji model matematik ekstraksi uap minyak atsiri daun basil, berdasarkan perpindahan difusi dan konveksi simultan ke fasa uap. Andras *dkk.*, (2015) mengemukakan kinetika hidrodistilasi minyak atsiri sejumlah tanaman dinyatakan dengan kinetika orde satu. Model kinetika ekstraksi minyak atsiri *sandalwood* menggunakan persamaan orde dua juga telah dikembangkan oleh Kusuma & Mahfud (2015) berdasarkan dua proses simultan yang terjadi selama ekstraksi. Karakter kinetika ekstraksi orde dua dicirikan dengan jumlah minyak atsiri yang meningkat cepat di awal ekstraksi dan menurun secara perlahan hingga berakhirnya proses ekstraksi (Kusuma & Mahfud, 2015).

Kajian model kinetika ekstraksi minyak atsiri lada hitam menggunakan ekstraksi *supercritical fluid* telah dilakukan oleh Ferreire *dkk.*, (2002) dengan mengembangkan *model Lack Plug Flow* dan pendekatan mekanisme adsorpsi-desorpsi. Kinetika ekstraksi minyak atsiri penting untuk memahami fenomena, mengoperasikan, mengoptimasi, mengendalikan dan merancang distilasi di industri (Milojević *dkk.*, 2013; Cassel *dkk.*, 2009). Model kinetika berperan untuk mengkaji proses distilasi ditinjau dari teknologi dan keekonomisan proses.

Berdasarkan hasil kajian peneliti sebelumnya, kinetika ekstraksi minyak atsiri tanaman didekati oleh dua proses simultan yaitu difusi dan konveksi yang terwakili oleh model kinetika ekstraksi orde satu dan orde dua. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji ekstraksi minyak atsiri lada hitam secara hidrodistilasi menggunakan dua model kinetika yaitu

Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum*) Secara Hidrodistilasi

model kinetika ekstraksi orde satu dan orde dua serta mengetahui nilai parameter kinetika yang berkesesuaian.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap yaitu ekstraksi lada hitam menggunakan metode hidrodistilasi serta penentuan model dan parameter kinetika ekstraksi yang paling sesuai.

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan *aquadest*, batu didih, dan lada hitam yang berasal dari petani lada di Desa Tegalminangun Kecamatan Sumberejo Kabupaten Tanggamus Provinsi Lampung.

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi *Clavenger*, timbangan analitis, dan ayakan 40 *mesh*.

Penyiapan Bahan

Penyeragaman kadar air biji lada hitam dilakukan dengan menjemur biji lada hitam dibawah sinar matahari selama 2 hari hingga kadar air mencapai 12%, kemudian lada digiling dan di ayak menggunakan ayakan 40 *mesh*.

Hidrodistilasi Lada Hitam

Sebanyak 35 gram lada hitam bubuk ditempatkan dalam labu didih 1 L dan diberi *aquadest* sebanyak 350 mL. Distilasi dilaksanakan pada 100°C selama 5 jam dengan pengamatan jumlah volume minyak atsiri yang terbentuk setiap 15 menit. Perolehan minyak atsiri dihitung menggunakan persamaan (1) (Kusuma & Mahfud, 2015).

$$y = \frac{v}{w} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

y adalah rendemen minyak atsiri lada hitam (%), v adalah berat minyak atsiri lada hitam yang

terekstrak (g) dan w adalah berat lada hitam bubuk (g).

Model dan Parameter Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam

Model kinetika ekstraksi dapat dinyatakan sebagai berikut :

Model Kinetika Orde Satu

Kinetika ekstraksi orde satu bermakna perubahan konsentrasi minyak atsiri setiap saat merupakan fungsi dari selisih antara konsentrasi minyak atsiri dalam keadaan jenuh (C_s) dengan konsentrasi minyak atsiri lada (C_t) saat t (menit) yang dinyatakan pada persamaan (2) (Kusuma *dkk.*, 2017; Alara & Abdurahman, 2019).

$$\frac{dC_t}{dt} = k_1(C_s - C_t) \dots \dots \dots (2)$$

dengan k_1 adalah konstanta laju ekstraksi minyak atsiri lada hitam orde satu (min^{-1}), C_s adalah konsentrasi minyak atsiri lada pada keadaan jenuh yang merupakan kapasitas ekstraksi minyak lada (g L^{-1}) dan C_t adalah konsentrasi minyak atsiri lada (g L^{-1}) saat t (menit).

Nilai konstanta laju dan kapasitas ekstraksi minyak atsiri orde satu diperoleh dengan mengintegrasikan persamaan (2) dengan kondisi kondisi batas $C_t = 0$ saat $t = 0$ dan $C_t = C_t$ saat $t = t$, sehingga diperoleh persamaan (3) berikut:

$$\ln \frac{C_s}{C_s - C_t} = k_1 t \dots \dots \dots (3)$$

Menurut Kusuma *dkk.* (2017), persamaan (3) dapat dinyatakan menjadi persamaan (4). Nilai konstanta laju ekstraksi dan kapasitas ekstraksi orde satu yaitu k_1 dan C_s diperoleh dari persamaan regresi linier antara data $\log(C_s - C_t)$ terhadap t.

$$\log(C_s - C_t) = \log C_s - \frac{k_1}{2,303} t \dots \dots \dots (4)$$

Model Kinetika Orde Dua

Mekanisme kinetika ekstraksi orde dua melibatkan dua proses simultan (Kusuma & Mahfud, 2015), diawali dengan peningkatan jumlah minyak atsiri yang terekstraksi dengan cepat dan diikuti dengan penurunan laju pembentukan minyak atsiri hingga tercapai keadaan kesetimbangan dimana tidak ada lagi penambahan volume minyak atsiri. Laju ekstraksi minyak atsiri lada hitam yang dinyatakan dengan kinetika orde dua dapat dilihat pada persamaan (5).

$$\frac{dC_t}{dt} = k_2(C_s - C_t)^2 \dots \dots \dots (5)$$

dengan k_2 adalah konstanta laju ekstraksi minyak atsiri lada hitam orde dua ($\text{g}^{-1} \text{L} \text{menit}^{-1}$).

Persamaan (5) diintegrasikan dengan kondisi batas $C_t = 0$ saat $t = 0$ dan $C_t = C_t$ saat $t = t$ sehingga didapat persamaan (6).

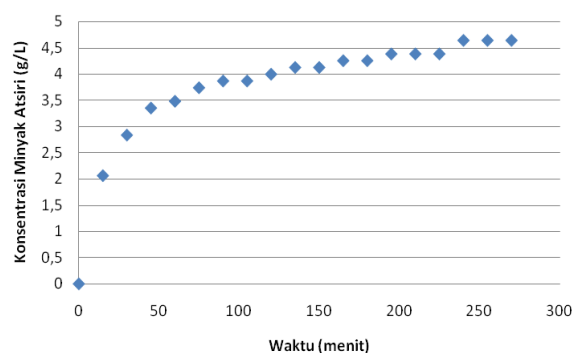
$$\frac{t}{C_t} = \frac{1}{k_2 C_s^2} + \frac{t}{C_s} \dots \dots \dots (6)$$

Laju awal ekstraksi dapat dinyatakan dengan h , yaitu $k_2 C_s^2$ dimana C_s merupakan kapasitas ekstraksi minyak atsiri (g L^{-1}) (Kusuma *dkk.*, 2017). Nilai h , k_2 dan C_s diperoleh dari nilai slope dan intercept garis regresi linier antara data t terhadap t/C_t .

Kesesuaian model kinetika untuk ekstraksi minyak atsiri lada dievaluasi dari nilai koefisien korelasi, *R-square* dan nilai error yang diwakili oleh nilai MAPE (*Mean Absolute Percentage Error*), MPE (*Mean Percentage Error*), MAE (*Mean Absolute Error*), RMSE (*Root Mean Square Error*), dan MSE (*Mean Square Error*) dari masing-masing model kinetika (Alara & Abdurahman, 2019; Izadifar & Abdolahi, 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian, konsentrasi minyak atsiri lada meningkat secara cepat diawal proses ekstraksi hingga menit ke-50, dan melambat setelah menit ke-50. Konsentrasi minyak atsiri lada mencapai nilai maksimum pada menit ke 240 seperti terlihat pada Gambar 1, hal ini menandakan minyak atsiri mencapai keadaan jenuh (Milojević *dkk.*, 2013).



Gambar 1. Konsentrasi Minyak Atsiri Lada Hitam (g/L)

Rendemen diakhir ekstraksi minyak atsiri lada hitam adalah 5,14%. Nilai rendemen minyak atsiri lada hitam tersebut lebih tinggi dari rendemen minyak lada asal Sajingan Kalimantan Barat, Marroco dan Vietnam masing-masing yaitu 1,27% (Anggraini *dkk.*, 2018), 1,45% (Rmili *dkk.*, 2014) dan 2,45% (Tran *dkk.*, 2019). Nilai rendemen minyak atsiri dipengaruhi spesies tanaman, lokasi tanam, umur panen dan metode distilasi (Rmili *dkk.*, 2014; Filly *dkk.*, 2014).

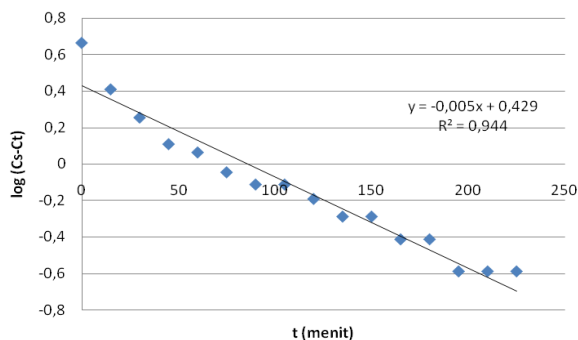
Peningkatan temperatur diawal ekstraksi mengakibatkan peningkatan tekanan yang terdapat di dalam bagian tanaman yang mengandung minyak atsiri dan pada tekanan tertentu mengakibatkan pecahnya dinding sel yang diikuti dengan pelepasan minyak atsiri (Maharaj & McGaw, 2020). Hal tersebut mengakibatkan laju ekstraksi minyak atsiri

Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum*) Secara Hidrodistilasi

meningkat tajam diawal proses, kemudian diikuti dengan difusi minyak atsiri yang terdapat di bagian dalam bahan baku ke permukaan yang dicirikan dengan melambatnya laju ekstraksi. Fenomena laju ekstraksi yang tinggi diawal proses dan diikuti difusi minyak atsiri dari bagian dalam ke permukaan padatan menjadi ciri khas dari ekstraksi minyak atsiri yang berasal dari tanaman (Milojević *dkk.*, 2013). Asumsi model kinetika yang diusulkan adalah penggabungan kedua fenomena diatas. Sehingga laju ekstraksi dapat didekati dengan beberapa persamaan kinetika yaitu orde satu dan orde dua.

Kinetika Ekstraksi Orde Satu

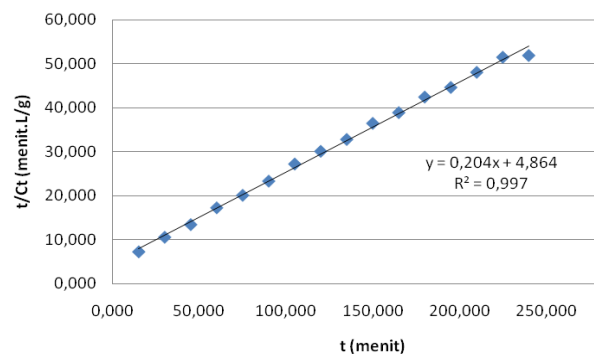
Hasil plot $\log(C_s - C_t)$ terhadap t sebagaimana Gambar 2 dan dengan menggunakan persamaan (4), diperoleh nilai *intercept* yang menyatakan besarnya nilai $\log C_s$, dimana C_s merupakan kapasitas ekstraksi. Nilai konstanta laju ekstraksi peroleh dari nilai kemiringan grafik pada Gambar 2 dikalikan dengan 2,303 (persamaan 4), sehingga diperoleh nilai laju ekstraksi dan kapasitas ekstraksi orde satu masing-masing sebesar 0,0115 ($\text{g.L}^{-1}\text{menit}^{-1}$) dan 2,685 (g.L^{-1}) dengan nilai *R-square* 0,9444.



Gambar 2. Kurva Model Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam Orde Satu

Kinetika Ekstraksi Orde Dua

Berdasarkan kurva pada Gambar 3, diperoleh *slope* sebesar 0,204, dari persamaan (6) didapat kapasitas ekstraksi minyak atsiri lada atau C_s model kinetika orde dua adalah $4,9 \text{ g L}^{-1}$. Sedangkan laju awal ekstraksi, h , yaitu $k_2 C_s^2$ diperoleh dari nilai *intercept* dan persamaan (6) yaitu $0,206 \text{ g L}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Nilai konstanta laju ekstraksi orde dua, k_2 , diperoleh menggunakan persamaan (6) yaitu $0,0086 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}\text{menit}^{-1}$. Nilai *R-square* dari model ekstraksi orde dua ini adalah 0,997.



Gambar 3. Kurva Model Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam Orde Dua

Nilai koefisien determinasi, R^2 , dari kedua model yang diajukan, nilai R^2 model kinetika yang paling mendekati 1 adalah model kinetika orde dua. Hasil perhitungan beberapa fungsi eror terhadap masing-masing model kinetika tertera pada Tabel 1. Model kinetika orde dua memiliki nilai persentase MAPE dan MPE lebih kecil dari model kinetika orde satu, masing-masing sebesar 2,230% dan 0,271%. Hal tersebut selaras dengan nilai MAE, MSE dan RMSE, sehingga dapat disimpulkan kinetika ekstraksi minyak atsiri lada hitam mengikuti model kinetika ekstraksi orde dua.

Tabel 2 memperlihatkan kinetika ekstraksi minyak atsiri beberapa tanaman

Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum*) Secara Hidrodistilasi

dengan mengikuti model kinetika orde dua dan konstanta laju ekstraksi, k maupun

konsentrasi minyak atsiri keadaan jenuh (C_s) dipengaruhi oleh spesies tanaman.

Tabel 1. Error Model Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Lada Hitam

Model Kinetika	MAE	MSE	RMSE	MAPE (%)	MPE (%)
Orde Satu	0,238	0,488	0,698	45,32	14,60
Orde Dua	0,077	0,009	0,094	2,230	0,271

Tabel 2. Kinetika Ekstraksi Minyak Atsiri Berbagai Tanaman

Tanaman	Metode	Orde	C_s (g L ⁻¹)	k	h (g L ⁻¹ min ⁻¹)	R^2	Ref.
Sandalwood	Microwave Hydrodistillation	2	0,6015	0,0642	0,0232	0,9597	Kusuma & Mahfud, 2015
Vertiver	Microwave Hydrodistillation	2	6,2189	0,0007	0,029	0,9427	Kusuma dkk., 2017
Lada hitam	Hidrodistilasi	2	4,9	0,0086	0,206	0,997	Penelitian ini

KESIMPULAN

Ekstraksi minyak atsiri lada hitam secara hidrodistilasi menghasilkan rendemen eksperimen sebesar 5,14% dengan kinetika ekstraksi mengikuti model kinetika orde dua. Nilai parameter kinetika ekstraksi minyak atsiri lada hitam yaitu kapasitas ekstraksi minyak atsiri lada, C_s , laju awal ekstraksi, h , dan konstanta laju ekstraksi, k masing-masing adalah 4,9 g L⁻¹, 0,206 g L⁻¹menit⁻¹ dan 0,0086 g⁻¹L⁻¹menit⁻¹, dengan nilai determinasi sebesar 99,7%. Berdasarkan penelitian ini perlu dikembangkan kajian untuk mendapatkan rendemen minyak atsiri yang optimal melalui penggunaan metode distilasi yang berbeda seperti *microwave hydrodistillation*.

DAFTAR RUJUKAN

Alara O. R. & Abdurahman N. H. (2019). Kinetics Studies On Effects Of Extraction Techniques On Bioactive Compounds From *Vernonia cinerea* Leaf. *J Food Sci Technol.*, 56, 580-588. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3512-4>.

Andras, C.D., Volf, I., Salamon R.,V., Barabas, I., & Szep, A. (2015). Influence of Extraction Methods On Caraway (*carum carvi* l.) Essential Oil Yield And Carvone/Limonene Ratio. *Environmental Engineering and Management Journal*, 14(2), 341-347.

<https://doi.org/10.30638/eemj.2015.034>

Anggraini, R., Jayuska, A., & Alimuddin, A.H. (2018). Isolasi dan Karakterisasi Minyak Atsiri Lada Hitam (*Piper nigrum* l.) Asal Sajingan Kalimantan Barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 7(4), 124-133.

Cassel, E., Vargas, R.M.F., Martinez, N., Lorenz, D. & Dellacassa, E. (2009). Steam Distillation Modeling for Essential Oil Extraction Process. *Industrial Crops And Products*, 29(1), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.017>.

Filly, A., Fernandez. X., Minuti, M., Chemat, F., Visinoni, F., & Cravotto, G. (2014). Solvent-free Microwave Extraction Of Essential Oil From Aromatic Herbs : From Laboratory to Pilot And Industrial Scale. *Food Chemistry*, 1(150), 193-198.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.139>.
- Izadifar, M., & Abdolahi F. (2006). Comparison Between Neural Network and Mathematical Modeling Of Supercritical CO₂ Extraction Of Black Pepper Essential Oil. *J. of Supercritical Fluids*, 38(1), 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.11.012>.
- Kumoro, A. C., Hasan, M. & Singh, H. (2010). Extraction of Sarawak Black Pepper Essential Oil Using Supercritical Carbon Dioxide. *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 35(2B), 7-16.
<https://pdfs.semanticscholar.org/d7fd/f7cecf4a3e76>
- Kusuma, H. S., & Mahfud, M. (2015). Preliminary Study: Kinetics of Oil Extraction from Sandalwood by Microwave-assisted Hydrodistillation. *ASEAN Journal of Chemical Engineering*, 15(2), 62–69.
<https://doi.org/10.22146/ajche.49687>
- Kusuma, H.S., Rohadi, T.I., Daniswara, E.F., Altway, A. & Mahfud. (2017). Preliminary Study: Comparison of Kinetic Models of Oil Extraction from Vetiver (*Vetiveria Zizanioides*) by Microwave Hydrodistillation. *Korean Chem. Eng. Res.*, 55(4), 574-577.
<https://doi.org/10.9713/kcer.2017.55.4.574>
- Maharaj, S. & McGaw, D. (2020). Mathematical Model for the Removal of Essential Oil Constituents during Steam Distillation Extraction. *Processes*, 8(400), 2-13.
<https://doi.org/10.3390/pr8040400>.
- Martinelli, L., Rosa, J.M., Ferreira C.,S.,B., Nascimento G.,M.,L., Freitas, M.S., Pizato, L.C., Santos W.,O., Pires, R.F., Okura, M.H., Malpass G.R.P., & Granato, A.C. (2017). Antimicrobial Activity And Chemical Constituents Of Essential Oils And Oleoresins Extracted From Eight Pepper Species. *Ciência Rural, Santa Maria*, 47(05), 1-7.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160899>.
- Milojević, S.Z., Radosavljević D.B., Pavićević V. P., Srđan,P., & Veljković V., B. (2013). Modeling The Kinetics of Essential Oil Hydrodistillation from Plant Materials. *Hemijaska Industrija*, 67(5), 843-859.
<https://doi.org/10.2298/HEMIND121026009M>.
- Mohammed, G.,J., Omran, A.,M., & Hussein H.M. (2016). Antibacterial and Phytochemical Analysis of *Piper nigrum* using Gas Chromatography – Mass Spectrum and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *International. Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(6), 977-996.
<http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/8/IJPPR,Vol8,Issue6,Article14.pdf>
- Nisa N., I., F. & Aminudin, A. (2019). Pengaruh Waktu Distilasi Etanol-Air Terhadap Konsentrasi Overhead Product dan Bottom Product. *Chemical Engineering Research Articles*, 2(1), 19-25.
<http://doi.org/10.25273/cheesa.v2i1.4469>
- Rmili R., Ramdani, M., Ghazi, Z., Saidi, N., & Mahi, B.,E. (2014). Composition Comparison Of Essential Oils Extracted by Hydrodistillation and Microwave-Assisted Hydrodistillation from *Piper nigrum* L. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(5), 1560-1567.
https://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol5/vol5_N5/167-JMES-917-2014-Rmili.pdf
- Ruth, S.M., Jensen M., Silvis, I.,C.,J., A, Ramos, M.E., Luning, P.A., Elliott, C.,T., & Alewijen, M. (2019), Cool comparison of black and white pepper grades. *Food Science and Technology*, 106, 122-127.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.054>.

Tran, T.H., Ha L.K., Nguyen D.C., Nhan L.,T.,H., Nguyen D.,H., Nguyen T.,D.,Vo D.,V.,N., Tran , Q.,T. & Bach L.,G. (2019). The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Pipernigrum* L.) Seeds Harvested in Gia Lai Province,Vietnam. *Processes*, 7(56), 2-16.

<https://doi.org/10.3390/pr7020056>

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer

*Characterization of Drying Shallots (*Allium cepa* L.) Using Tray Dryer*

Rintis Manfaati^{1*}, Hibah Baskoro¹, Muhammad Muhlis Rifai¹

¹Politeknik Negeri Bandung, D3 Teknik Kimia, Indonesia

*email: rintis.manfaati@polban.ac.id

Received: 18/10/20; Revised: 18/11/20; Accepted: 26/11/20

Abstrak

Pengeringan bawang merah (*Allium cepa* L.) menggunakan *tray dryer* bertujuan menghasilkan produk sesuai standar bahan kering, tetapi kadar nutrisinya tetap dipertahankan. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari karakteristik proses pengeringan bawang merah melalui beberapa tinjauan yaitu kadar air bawang merah setelah pengeringan, laju pengeringan konstan (R_c), kadar air bebas kritis (X_c), parameter pengeringan (k), profil kurva laju pengeringan menurun dan nilai difusivitas rata-rata. Pengeringan dilakukan pada bawang merah dengan kadar air awal 82,5%, dan ketebalan 1-2 mm. Suhu pengeringan divariasikan pada rentang 50-70 °C, waktu pengeringan 6 jam dan laju udara pengeringan 2,0 m/s. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum pengeringan adalah 70 °C dengan kadar air bawang merah setelah pengeringan adalah 8,3896%, nilai R_c yaitu 1,2968 kg/jam.m², nilai X_c yaitu 2,3044 kg air/kg bahan kering dan nilai k adalah 0,0173 menit⁻¹. Profil perpindahan air terikat dalam bawang merah terjadi secara difusi dengan nilai difusivitas rata-rata (D_L) adalah $1,5556 \cdot 10^{-10}$ m²/detik.

Kata kunci: bawang merah; difusivitas; kadar air; laju pengeringan; *tray dryer*

Abstract

Drying shallots using a tray dryer aims to produce dry material according to standards but the nutritional content is maintained. The purpose of this study was to know the characteristics of the shallot drying process through several reviews, namely the moisture content of shallots after drying, constant drying rate (R_c), critical free water content (X_c), drying parameter (k), curve of drying falling rate profile and the average diffusivity (D_L). Drying is carried out on the shallots with initial moisture content of 82.5%, and a thickness 1-2 mm. Drying temperatures was varied in the range of 50-70 °C, drying time of 6 hours and drying air rate of 2.0 m/s. The results showed that the optimum temperature for drying shallots using a Tray Dryer was 70 °C with the moisture content of shallots after drying was 8.3896%, The R_c value was 1.2968 kg/hour.m², the X_c value was 2.3044 kg of water/kg of material dry and the k value was 0.0173 minute⁻¹. The transfer of bound water in shallots occurs diffusion where the average diffusivity (D_L) was $1.5556 \cdot 10^{-10}$ m²/s.

Keywords: *diffusivity; drying rate; moisture content; shallots; tray dryer.*

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan *Tray Dryer*

PENDAHULUAN

Total produksi nasional bawang merah pada tahun 2018 mencapai 1,503 juta ton. Produksi bawang merah nasional tahun 2018 tumbuh sebesar 2,26 persen dibandingkan tahun 2017. Enam provinsi penghasil bawang merah utama adalah Jawa Tengah, Jawa Timur, Nusa Tenggara Barat, Jawa Barat, Sumatera Barat dan Sulawesi Selatan (Adhiwibowo & Ramadhanty, 2018). Peningkatan produksi bawang merah setiap tahun, menyebabkan stok bawang merah melimpah sehingga harga bawang merah akan turun.

Bawang merah digunakan sebagai penyedap masakan di beberapa negara. Bawang merah memiliki kandungan bahan-bahan kimia yang bermanfaat seperti serat alami, berbagai vitamin, asam organik, senyawa-senyawa *phenolic* dan antioksidan (Mitra *dkk.*, 2012). Setiap 100 gram bawang merah mengandung 84,18 gram air, 0,93 gram serat dan 2,43 gram protein (Rodrigues *dkk.*, 2003).

Pengeringan bawang merah sampai kadar air kurang dari 10 % akan mencegah pertumbuhan mikroorganisme sehingga dapat memperpanjang umur penyimpanan dan meningkatkan nilai tambah dari produk tersebut. Pengeringan bawang merah secara konveksi, dengan memanfaatkan panas matahari umum dilakukan. Pengeringan dengan cara ini dapat menghemat biaya untuk energi pengeringan tetapi membutuhkan waktu yang lama dan tergantung pada kondisi cuaca. Pada musim hujan, kandungan uap air/kelembaban cukup tinggi maka proses pengeringan menggunakan sinar matahari tidak menghasilkan proses pengeringan yang sempurna karena adanya karakter *sorption isotherm* (Sasongko *dkk.*, 2020).

Salah satu metode pengolahan dan pengawetan bawang merah adalah melalui

pengeringan menggunakan *tray dryer*. Proses pengeringan menggunakan *tray dryer* termasuk dalam jenis pengeringan langsung, dimana media pengering (udara panas) berkontak langsung dengan bahan yang akan dikeringkan. Bahan yang akan dikeringkan harus berbentuk lembaran yang dihamparkan diatas *tray* agar produk mengering secara merata.

Proses pengeringan melibatkan dua proses perpindahan yaitu perpindahan panas yang terjadi dari media pengering ke bahan yang akan dikeringkan, dan perpindahan massa yang terjadi dari bahan yang akan dikeringkan ke media pengering. Proses pengeringan dimulai saat udara panas yang mengalir melintasi permukaan lembaran padatan. Perpindahan panas terjadi secara konduksi melalui *tray* yang panas atau secara radiasi melalui permukaan bahan yang dipanaskan (Misha *dkk.*, 2013). Udara panas yang mengalir akan melepaskan sebagian panasnya sehingga terjadi proses penguapan/perpindahan massa air dari bahan yang dikeringkan ke udara tersebut sampai mencapai kondisi kesetimbangan.

Pengeringan bawang merah menggunakan *tray dryer* harus menghasilkan produk sesuai standar bahan kering, tetapi kadar nutrisinya tetap dipertahankan. Pengeringan pada suhu tinggi dapat menurunkan kandungan vitamin C, merubah warna dan mengurangi kandungan nutrisi lain (Mota *dkk.*, 2010). Penelitian pengeringan menggunakan *tray dryer* ataupun peralatan pengeringan lain seperti *fluidized drying* untuk bawang merah dan produk pangan lain seperti parsley, kopi, jagung dan padi selalu dilakukan pada suhu pengeringan kurang dari 70 °C (Sasongko *dkk.*, 2020; Hancioglu *dkk.*, 2010; Pradana *dkk.*, 2019; Djaeni & Perdanianti, 2019; Djaeni *dkk.*,

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer

2011; Santoso *dkk.*, 2018; Nugraha *dkk.*, 2011; Djaeni *dkk.*, 2013).

Setiap bahan padat yang dikeringkan memiliki karakteristik pengeringan yang berbeda-beda. Karakteristik pengeringan tersebut adalah kadar air produk setelah pengeringan, laju pengeringan konstan (R_c) dan kadar air bebas kritis (X_c). Laju pengeringan berkaitan dengan proses pengeringan yang terdiri dari dua periode utama yaitu, periode pengeringan dengan laju pengeringan konstan (*Constant Rate Periode*) dan periode pengeringan dengan laju pengeringan menurun (*Falling Rate Periode*). Kedua periode ini dibatasi oleh kadar air bebas kritis (X_c) (Geankoplis, 1993).

Djaeni & Perdanianti (2019) telah melakukan penelitian pengeringan bawang merah yang lebih berkembang. *Tray dryer* dioperasikan secara *batch* dengan menggunakan udara panas yang telah didehumidifikasi menggunakan tiga jenis *dessicant* yaitu karbon aktif, silika gel dan zeolit. *Dessicant* digunakan untuk menyerap uap air dalam udara pengering, sehingga diharapkan dapat mengurangi energi untuk pengeringan dan mempersingkat waktu pengeringan. Tiga model kinetika pengeringan Lapis Tipis digunakan, sehingga dihasilkan parameter pengeringan k (menit^{-1}). Kelemahan penggunaan *dessicant* dalam proses pengeringan adalah diperlukan energi yang cukup tinggi untuk meregenerasi *dessicant* yang jenuh. Untuk melepaskan 1 kg air dari *dessicant* zeolit tipe 13X yang jenuh dibutuhkan energi sebesar 3200 kJ (Djaeni *dkk.*, 2013).

Penelitian pengeringan bawang merah tanpa mengaplikasikan *dessicant* masih tetap terbuka untuk dilakukan, agar proses pengeringan dapat dipahami lebih mendalam melalui karakteristik

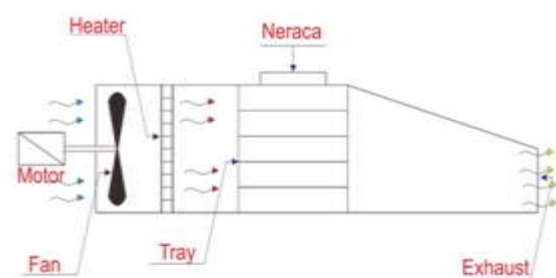
pengeringan lain yaitu kadar air bawang merah setelah pengeringan, laju pengeringan konstan (R_c), kadar air bebas kritis (X_c), parameter pengeringan (k), dan profil kurva laju pengeringan menurun serta nilai difusivitas rata-rata (D_L).

METODE PENELITIAN

Perlakuan awal terhadap bawang merah adalah pengupasan dan pengirisan dengan ketebalan 1-2 mm. Bawang merah yang telah diiris disusun dalam *tray* berlubang yang memiliki luas 20x20 cm. Laju alir udara pengering adalah 2,0 m/s dan waktu pengeringan adalah 6 jam. Suhu pengeringan divariasikan pada rentang 50-70 °C. Pengambilan data berupa massa bawang merah dilakukan setiap 10 menit,

Alat yang digunakan adalah *Tray Dryer Electronica Veneta* yang dilengkapi pemanas berdaya 2,7 kW, *tray*, anemometer, termometer bola basah dan bola kering, cawan pijar, *stop watch*, oven, desikator. Skema *tray dryer* yang digunakan disajikan pada Gambar 1.

Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri. Prosedur analisis ini adalah dengan mengeringkan bawang merah dalam oven pada suhu 105 °C selama 3 jam sehingga seluruh air yang terdapat dalam bahan menguap dengan ditandai dengan massa bahan yang konstan.



Gambar 1. Skema *Tray Dryer*

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer

Laju pengeringan dapat diperoleh dengan persamaan (1) berikut:

$$R = - \frac{Ls}{A} \times \frac{dX}{dt} \dots\dots\dots(1)$$

R = laju pengeringan (kg/jam.m²)
 Ls = berat kering bahan pada tray (kg)
 A = luas permukaan saat pengeringan (m²)
 (Geankoplis, 1993).

Kurva pengeringan dapat pula disajikan dalam bentuk rasio kadar air bahan (M_R) terhadap waktu pengeringan (t). Parameter kinetika (k) dapat diperoleh melalui persamaan kinetika Pengeringan Newton sebagai berikut:

$$M_R = e^{-kt} \dots\dots\dots(2)$$

$$M_R = \frac{M_t}{M_o} \dots\dots\dots(3)$$

M_t = kadar air saat waktu pengeringan t
 M_o = kadar air awal
 k = parameter pengeringan (menit⁻¹)
 (Lewis, 1921)

Nilai difusivitas rata-rata diperoleh dengan menggunakan persamaan berikut:

$$D_L = \left[\frac{D_L t}{x_1^2} \right]_{\text{tabel}} \frac{x_1^2}{t} \dots\dots\dots(4)$$

D_L = difusivitas rata-rata (m²/detik)
 t = waktu pengeringan (detik)
 x₁² = tebal irisan bahan (m).
 (Geankoplis, 1993).

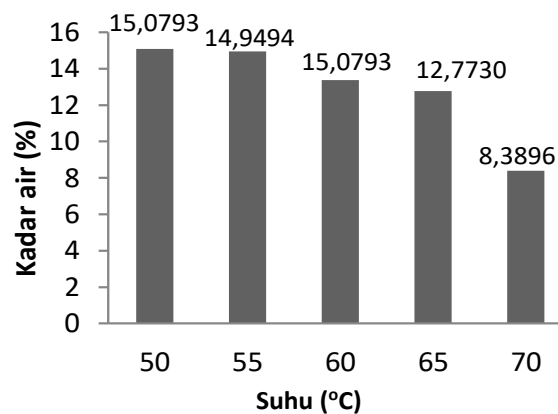
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air Bawang Merah

Pengaruh suhu terhadap kadar air bawang merah setelah proses pengeringan disajikan pada Gambar 2. Semakin besar suhu pengeringan yang digunakan dalam proses pengeringan maka semakin rendah kadar air produk yang dihasilkan. Pada suhu pengeringan 50-65 °C kadar air produk yang dihasilkan masih di atas 10%.

Produk dengan kadar air terendah diperoleh pada suhu 70 °C yaitu 8,3896%.

Semakin tinggi suhu udara pengeringan akan menghasilkan *driving force* yang yang besar sehingga meningkatkan perpindahan air dari padatan ke udara pengering. Kadar air produk bisa diturunkan lebih rendah dengan cara meningkatkan suhu pengeringan, tetapi dikhawatirkan akan merusak kandungan nutrisi dalam bawang merah. Alternatif lain untuk meningkatkan *driving force* adalah dengan mengaplikasikan *dessicant* seperti karbon aktif, silika gel dan zeolit adsorben sehingga dihasilkan udara pengering yang terdehumidifikasi (Djaeni & Perdanianti, 2019).

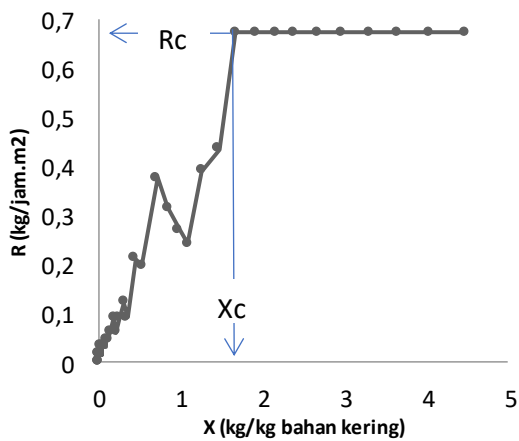


Gambar 2. Kadar Air Bawang Merah setelah Pengeringan pada Berbagai Suhu Pengeringan

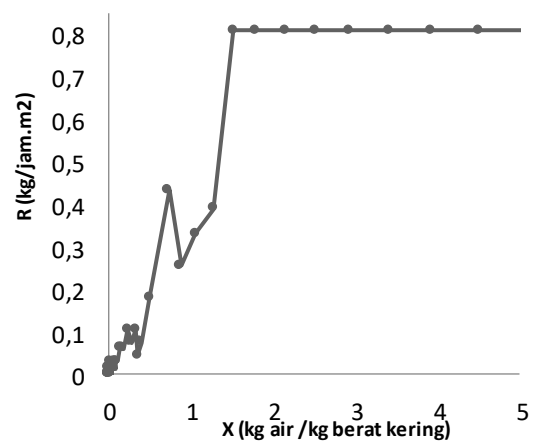
Laju Pengeringan

Kurva laju pengeringan menunjukkan karakteristik pengeringan untuk setiap bahan pada kondisi suhu, kecepatan alir udara pengering, dan tekanan yang spesifik (Traub, 2002). Kurva pengeringan untuk rentang suhu pengeringan 50-70 °C disajikan pada Gambar 3 sampai dengan Gambar 7 sedangkan rasio kadar air dapat dilihat pada Gambar 8. Kadar air bebas kritis (X_c), laju pengeringan konstan (R_c) dan parameter pengeringan (k) pada berbagai suhu pengeringan disajikan pada Tabel 1.

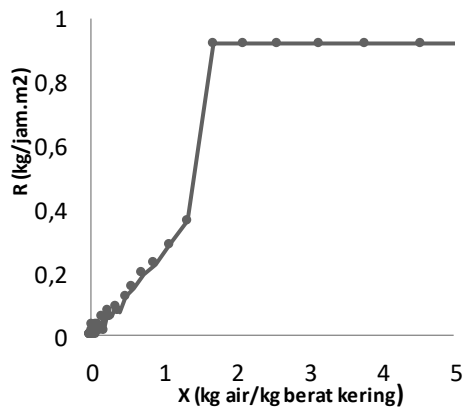
Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer



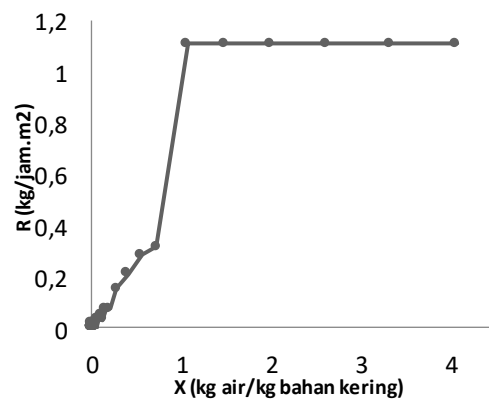
Gambar 3. Laju Pengeringan (R) terhadap Kadar Air Bebas (X) pada Suhu Pengeringan 50 °C



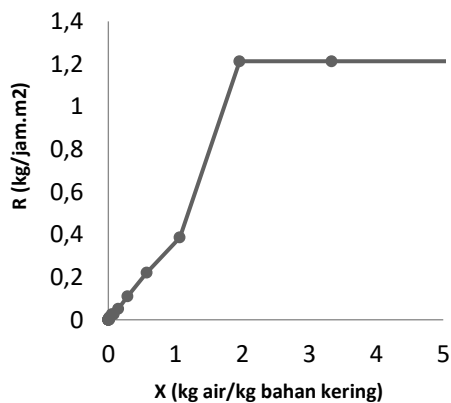
Gambar 4. Laju Pengeringan (R) terhadap Kadar Air Bebas (X) pada Suhu Pengeringan 55 °C



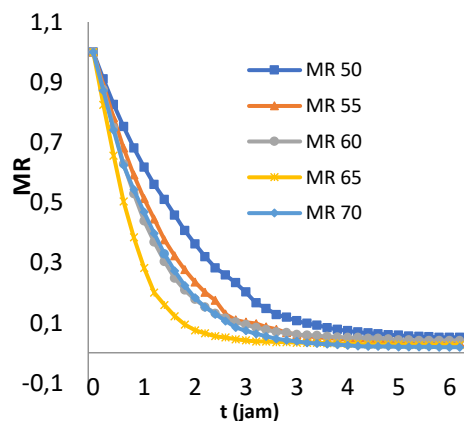
Gambar 5. Laju Pengeringan (R) terhadap Kadar Air Bebas (X) pada Suhu Pengeringan 60 °C



Gambar 6. Laju Pengeringan (R) terhadap Kadar Air Bebas (X) pada Suhu Pengeringan 65 °C.



Gambar 7. Laju Pengeringan (R) terhadap Kadar Air Bebas (X) pada Suhu Pengeringan 70 °C.



Gambar 8. Rasio Kadar Air bahan (MR) terhadap Waktu Pengeringan pada Berbagai Suhu Pengeringan

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer**Tabel 1.** Kadar Air Bebas Kritis (Xc), Laju Pengeringan Konstan (Rc) dan Parameter Pengeringan (k)

Suhu (°C)	Xc (kg air/kg bahan kering)	Rc (kg/jam.m ²)	k (menit ⁻¹)
50	1,6773	0,6726	0,0104
55	1,5152	0,8100	0,0158
60	1,6945	0,9178	0,0167
65	1,0719	1,1092	0,0229
70	2,3044	1,2968	0,0173

Pada proses pengeringan, air yang teruapkan terdiri dari air tidak terikat dan air terikat. Laju pengeringan tertinggi terjadi pada periode pengeringan konstan. Pada periode pengeringan konstan yang teruapkan adalah air yang tidak terikat yang membentuk lapisan tipis/*film* air kontinu dipermukaan bahan.

Suhu udara pengering sangat berpengaruh terhadap kecepatan pengeringan, semakin tinggi suhu pengeringan, semakin tinggi pula nilai laju pengeringan konstan (Rc). Tabel 1 menunjukkan bahwa laju pengeringan konstan tertinggi diperoleh pada suhu 70 °C yaitu 1,2968 kg/jam.m². Jika jumlah air tidak terikat pada setiap bahan yang dikeringkan adalah sama, maka dengan laju pengeringan lebih tinggi waktu pengeringan dapat dipersingkat. Waktu pengeringan yang lebih singkat akan menguntungkan secara ekonomis.

Kadar air bebas kritis (Xc) untuk suhu pengeringan 50-60 °C tidak menunjukkan perbedaan yang berarti, yaitu berada pada rentang 1,5152-1,6945 kg air/kg bahan kering. *Driving force* pada suhu pengeringan 50-60 °C tidak cukup untuk menarik air tidak terikat yang ada di bagian dalam padatan bawang merah untuk keluar ke permukaan dan menguapkannya, sehingga menghasilkan Xc yang relatif sama. Peningkatan cukup berarti terjadi pada suhu pengeringan 70 °C yaitu sebesar

2,3044 kg air/kg bahan kering. Pada suhu ini air tidak terikat yang terdapat di bagian dalam padatan akan ditarik dan teruapkan dengan sempurna sehingga air yang tertinggal dalam padatan selama periode pengeringan konstan adalah air yang terikat saja. Air yang terikat ini akan diuapkan selama periode laju pengeringan menurun.

Parameter pengeringan (k) yang diperoleh dari persamaan Newton untuk suhu pengeringan 70 °C adalah 0,0173 menit⁻¹. Nilai k ini lebih kecil dibandingkan dengan nilai k yang diperoleh pada pengeringan bawang merah suhu 70 °C dengan mengaplikasikan *dessicant* zeolit pada *tray dryer* yaitu 0,0374015 menit⁻¹ (Djaeni & Perdanianti, 2019). Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaplikasian *dessicant* akan meningkatkan kinerja dari *tray dryer*.

Profil kurva laju pengeringan menurun dapat menunjukkan pola perpindahan uap air. Perpindahan uap air ini dapat terjadi secara difusi atau melalui kapiler. Difusi uap air terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi uap air antara bagian dalam dan bagian permukaan padatan. Perpindahan uap air secara difusi biasanya terjadi pada padatan yang tidak berpori seperti pasta, sabun, gelatin, lem, tepung, kayu, kulit, kertas, tekstil dan berbagai bahan pangan (Geankoplis, 1993). Perpindahan uap air melalui kapiler terjadi karena pada saat air diuapkan akan terbentuk meniskus pada setiap pori. Meniskus menghasilkan tegangan permukaan air menyebabkan terbentuknya *capillary forces* yang merupakan *driving force* berpindahnya air melalui pori-pori ke permukaan. Perpindahan uap air melalui kapiler terjadi pada padatan berpori dan berbentuk *granular* seperti tanah liat, pasir,

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer

tanah, pigmen dan mineral (Geankoplis, 1993).

Gambar 5, 6 dan 7 menunjukkan bahwa suhu pengeringan yang lebih tinggi yaitu 60-70 °C menghasilkan kurva laju pengeringan menurun yang lebih stabil dibandingkan dengan suhu pengeringan yang lebih rendah 50 dan 55 °C (Gambar 3 dan 4). Profil kurva laju pengeringan menurun bawang merah menunjukkan bahwa berpindahnya uap air terjadi secara difusi dengan nilai difusivitas rata-rata (D_L) adalah $1,5556 \cdot 10^{10} \text{m}^2/\text{detik}$. Periode laju pengeringan menurun berlangsung mendekati linear hingga kadar air dalam bahan sama dengan kadar air kesetimbangan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum pengeringan bawang merah menggunakan tray dryer adalah 70 °C dengan kadar air bawang merah setelah proses pengeringan 8,3896%, nilai laju pengeringan konstan (R_c) $1,2968 \text{ kg/jam.m}^2$, kadar air bebas kritis (X_c) $2,3044 \text{ kg air/kg bahan kering}$ dan parameter pengeringan (k) $0,0173 \text{ menit}^{-1}$. Profil kurva laju pengeringan menurun bawang merah menunjukkan bahwa berpindahnya uap air terikat pada bawang merah terjadi secara difusi dengan nilai difusivitas rata-rata (D_L) adalah $1,5556 \cdot 10^{10} \text{m}^2/\text{detik}$.

DAFTAR RUJUKAN

Adhiwibowo, K., & Ramadhanty, A. (2018). *Distribusi Perdagangan Komoditas Bawang Merah Indonesia*. BPS RI/BPS-Statistics Indonesia. ISBN: 978-602-438-318-3 No. Publikasi: 06130.2007. Katalog: 8201018. Penertbit CV. NASIONAL INDAH. <https://www.bps.go.id>

- Djaeni, M., Agusniar, A., Setyani, D., & Hargono. (2011). Pengeringan Jagung dengan Metode *Mixed Adsorption Drying* Menggunakan Zeolite pada Unggun Terfluidisasi. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi ke-2*. Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- Djaeni, M., & Perdanianti, A. M., (2019). The Study Explores the Effect of Onion (*allium cepa l.*) Drying using Hot Air Dehumidified by Activated Carbon, Silica Gel and Zeolit. *The 3rd International Conference of Chemical and Material Engineering. IOP Conf.Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 1295 (2019), 012025. doi: 10.1088/1742-6596/1295/1/012025.
- Djaeni, M., Sasongko, S. B., & Van Boxtel, A. J. B. (2013). Enhancement of Energy Efficiency and Food Product Quality Using Adsorption Dryer with Zeolite. *Int.Journal of Renewable Energy Development (IJRED)*, 2(2), 81-86. doi: 10.14710/ijred.2.2.81-86.
- Geankoplis, C. J. (1993). *Transport Process and Unit Operations*. Edition 3rd. Prentice-Hall International, Inc.
- Hancioglu, E., Hepbasli, A., Icier, F., Erbay, Z., & Colak, N. (2010). Performance Investigation of Drying of Parsley in a Tray Dryer System. *Int. J. Exergy*, 7(2), 193-210. doi: 10.1504/ijex.2010.031240.
- Lewis, W. (1921). The Rate of Drying of Solid Materials. *Journal Ind.Eng.Chem.* 65(1), 427-431. doi: 10.1021/ie50137a021
- Misha, R, Mat, S., Ruslan, M. H., Sopian, K., & Salleh, E. (2013) Review on a Tray Dryer System for Agricultural Products. *World Applied Sciences Journal*, 22(3), 424-433. doi: 10-5829/idosi.wasj.2013.22.03.343.

Karakterisasi Pengeringan Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Menggunakan Tray Dryer

- Mitra, J., Shrivastava, S. L., & Rao, P. S. (2012). Onion Dehydration: a review. *Journal Food Sci. Technol.*, 49, 267-277. doi: 10.1007/s13197-011-0369-1.
- Mota, C. L, Luciano, C., Dias, M. J., Barroca, & Guine R. P. V., (2010). Convective Drying of Onion: Kinetic and Nutritional Evaluation. *Food Bioprod. Process.*, 8(2-3), 115-123. doi: 10.1016/j.fbp.2009.09.004.
- Nugraha, S., Adiandri, R.S., & Yulianingsih. (2011). Pelayuan dan Pengeringan Bawang Merah Menggunakan Instore Drying untuk Mempertahankan Mutu dan Mengurangi Tingkat Kerusakan. *Jurnal Pasca Panen*, 8(2),72-81.
- Pradana, G. B., Prabowo, K. B., Hastuti, R. P., Djaeni, M., & Prasetyaningrum, A., (2019). Seaweed Drying Process Using Tray Dryer with Dehumidified Air System to Increase Efficiency of Energy and Quality Product. *Internasional Conference on Food Science & Technology. Earth and Enviromental Science*, 292 (2019).012070. doi: 10.1088/1755-1315/292/1/012070.
- Rodrigues, A., Fogliano, V., Graziani G., Mendes, S., Vale, A. & Goncalves, C. (2003). Nutrition Value of Onion Regional Varieties in Northwest Portugal. *EJEAFChe*, 2(4), 519-524.
- Santoso, D., Muhidong, D., & Mursalim. (2018). Model Matematis Pengeringan Lapisan Tipis Biji Kopi Arabika (*Coffeae arabica*) dan Biji Kopi Robusta (*Coffeae cannephora*). *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*, 22(1), 86-95. doi: 10.25077/jtpa.22.1.86-95.2018
- Sasongko, S. B., Hadiyanto, H., Djaeni, M., Perdanianti A. M., & Utari F. B. (2020). Effect of Drying Temperature and Relative Humidity on the Quality of Dried Onion Slice. *Heliyon*, 6(7), e04338. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04338.
- Traub, D. A., (2002). *The Drying Curve Part 1*. <https://www.process-heating.com/articles/86586-the-drying-curve-part-1> (diakses pada 12 Juli 2019).

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

Synthesis of Bovine Serum Albumin Nanoparticle Combination of Cisplatin and Folic Acid as Anticancer Candidates

Ersalina Nidianti^{1*}), Ary Andini¹⁾, Nia Kurniaty Rukman²⁾

¹⁾Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya, Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Indonesia

²⁾Universitas Muhammadiyah Kupang, Pendidikan Matematika, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Indonesia

*email: ersalinanidianti@unusa.ac.id

Received: 04/11/20; Revised: 14/12/20; Accepted: 14/12/20

Abstrak

Kanker adalah penyakit tidak menular yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas di seluruh wilayah dunia. Salah satu pengobatan kanker adalah dengan menggunakan obat kemoterapi cisplatin. Namun cisplatin memiliki efek samping yang bersifat toksik jika dikonsumsi dalam dosis dan waktu tertentu. Kombinasi nanopartikel *bovine serum albumin* (BSA) yang mengandung cisplatin dikembangkan dengan modifikasi ikatan menggunakan asam folat sebagai solusi alternatif meminimalisir efek toksik yang dihasilkan dan mengoptimalkan sistem pengiriman obat. Tujuan penelitian adalah sintesis kombinasi nanopartikel BSA yang mengandung cisplatin dan modifikasi ikatan menggunakan asam folat sebagai kandidat antikanker. Penelitian ini dilakukan melalui sintesis dengan metode desolvasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel BSA yang dikombinasi dengan cisplatin dan asam folat telah berhasil disintesis. Analisis FT-IR menunjukkan bahwa ada gugus fungsi O-H alkohol, C-H, C-C, NO₂ yang berperan dalam sintesis nanopartikel. Analisis XRD menunjukkan adanya pergeseran *peak* dari NP-BSA 31,69 menjadi As-CP-NP-BSA 34,45; ukuran nanopartikel NP-BSA 2,38 nm dan As-CP-NP-BSA 2,62 nm sedangkan analisis SEM-EDX diketahui ada unsur C, O, Mg, Cl dan Pt.

Kata kunci: asam folat; BSA; cisplatin; sintesis nanopartikel; toksisitas

Abstract

Cancer is a non-communicable disease that causes morbidity and mortality in all regions of the world. One of the cancer treatments is using the chemotherapy drug cisplatin, but cisplatin has toxic side effects if consumed in certain doses and times. The combination of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles containing cisplatin was developed with binding modification using folic acid as an alternative solution to minimize the resulting toxic effects and optimize the drug delivery system. The research objectives were the synthesis of combined nanoparticles (BSA) containing cisplatin and modification of the bonds using folic acid as an anticancer candidate. This research was conducted through synthesis with the desolvation method. The results showed that the bovine serum albumin nanoparticles combined with cisplatin and folic acid were successfully synthesized. FT-IR analysis showed that the O-H functional groups of alcohol, C-H, C-C, NO₂ play a role in the synthesis of nanoparticles. XRD analysis shows that there is a peak shift from NP-BSA 31.69 and As-CP-NP-BSA 34.45. The size of NP-BSA nanoparticles was 2.38 nm and As-CP-NP-BSA 2.62 nm while SEM-EDX analysis of the elements of C, O, Mg, Cl and Pt.

Keywords: BSA; cisplatin; folic acid; nanoparticles synthesis; toxicity

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit tidak menular yang paling mengerikan di seluruh dunia dalam hal morbiditas dan mortalitas (Rahmani *dkk.*, 2014). Mortalitas penyakit kanker yang terus meningkat setiap tahunnya menjadi ancaman serius bagi kesehatan masyarakat di seluruh dunia (Kashyap *dkk.* (2019) & Dong *dkk.* (2019)). Berdasarkan data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia di tahun 2018 terdapat 18,1 juta kasus baru dengan angka kematian sebesar 9,6 juta kasus kematian karena penyakit kanker (Kementerian Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan, 2018).

Penyebab penyakit kanker tidak sepenuhnya diketahui secara pasti. Namun, kanker terjadi karena adanya perubahan genetik/mutasi genetik dari sel normal menjadi sel kanker (Rahmani *dkk.*, 2014). Teknologi pengobatan penyakit kanker dapat dilakukan melalui pembedahan, kemoterapi, terapi radiasi maupun terapi imun (Mutiah *dkk.*, 2018). Kemoterapi efektif digunakan dalam pengobatan kanker, tetapi menimbulkan beberapa efek samping seperti selektivitas yang rendah pada sel kanker, akumulasi konsentrasi obat yang rendah di lokasi target tumor, serta multi drug resisten (MDR) di dalam tubuh pasien penderita kanker (Dong *dkk.*, 2019). Salah satu jenis obat kemoterapi komersial adalah cisplatin.

Cisplatin diberikan melalui intervena sebagai infus jangka pendek dalam larutan *saline* untuk pengobatan kanker ganas. Pemberian cisplatin pada pengobatan kanker dapat memicu proses pembelahan sel yang tidak normal dan berpotensi menyerang sel yang berdekatan (Aldossary, 2019). Penggunaan secara klinis cisplatin dibatasi karena adanya efek samping yang bersifat toksik seperti

nefrotoksisitas, ototoksisitas, neurotoksisitas, hemotologitoksisitas, kardiotoxikitas, dan hepatotoksisitas. Karena efek toksisitas yang dihasilkan tersebut, penggunaan cisplatin dapat menurunkan kualitas hidup pasien penderita kanker sehingga mengurangi efek terapeutik (Qi *dkk.*, 2019).

Pada beberapa tahun terakhir para peneliti telah fokus pada kombinasi nanoteknologi. Nanoteknologi dapat diartikan sebagai formasi, pengembangan, peningkatan serta eksplorasi material berukuran nano (1-100 nm) (Garg & Garg, 2018). Nanoteknologi berperan untuk meminimalkan efek samping dari cisplatin dan meningkatkan efisiensi antineoplastik, kemanjuran obat serta dapat mengurangi toksisitas obat (Koo *dkk.*, 2013). Nanopartikel dalam kombinasi albumin dapat mengurangi toksisitas sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal (Dong *dkk.*, 2019). Albumin telah dikaji secara ekstensif sebagai sistem penghantar obat untuk meningkatkan kelarutan dan efek terapi obat (Koo *dkk.*, 2013).

Tujuan penelitian ini adalah sintesis kombinasi nanopartikel *bovine serum albumin* (BSA) yang mengandung cisplatin dan modifikasi ikatan menggunakan asam folat sebagai kandidat antikanker.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium kimia kesehatan, fakultas kesehatan-UNUSA.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: *hot plate*, *centrifuge*, instrumentasi seperti XRD, SEM-EDX, dan FT-IR.

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian: Etanol 95 %, Cisplatin, larutan *bovine serum albumin* (BSA), NaOH, larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Gluteraldehid, Asam folat, akuades, *aquabidest*, dan sorbitol.

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* (NP-BSA)

Sintesis nanopartikel *bovine serum albumin* (BSA) dilakukan dengan menggunakan teknik desolvasi, yaitu teknik pembuatan nanopartikel berdasarkan perbedaan kelarutan antara *desolvating agent* dengan pelarut air yang bercampur dengan BSA (Ambarwati, 2019). Larutan BSA (4% w/v) dibuat dengan melarutkan 4 gram BSA dalam 100 mL akuades dan diukur dengan pH meter diperoleh pH 7 kemudian ditambahkan etanol (0,5 mL/menit dengan interval 2 menit) serta dilakukan pengadukan menggunakan magnetik *stirrer* 600 rpm. Kemudian ditambahkan 8% gluteraldehid (1,7 $\mu\text{L}/\text{mg}$ BSA) didiamkan selama 6 jam pada temperatur ruang dan diaduk dengan magnetik *stirrer* (600 rpm) hingga terbentuk larutan keruh. Nanopartikel yang terbentuk dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi 2.000 rpm selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) yang steril hingga pH 6. Selanjutnya nanopartikel yang terbentuk disimpan dalam desikator (Alam *dkk.*, 2015). Hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 1A.

Sintesis NP-BSA dengan Obat Cisplatin (CP-NP-BSA)

NP-BSA yang terbentuk ditambahkan dengan obat cisplatin injeksi 10 mg diinkubasi selama 24 jam, suhu 37 °C kemudian dilakukan pengadukan *stirrer* 600 rpm kemudian ditambahkan 5 mL

NaOH 0,1 N (Alam *dkk.*, 2015). Hasil sentrifugasi yang terbentuk kemudian dilakukan pengeringan dengan menggunakan *hotplate* dan *dioven* pada suhu 40 °C selama 6-8 jam hingga diperoleh bentuk serbuk.

Sintesis CP-NP-BSA Kombinasi Asam Folat (As- CP-NP-BSA)

CP-NP-BSA dimodifikasi dengan asam folat. Asam folat ditambahkan dengan PBS & Sorbitol dengan perbandingan 1:2:2 kemudian distirer 15 menit pada temperatur ruang (28-32 °C). Jumlah CP-NP-BSA yang ditambahkan masing-masing sebanyak 20 mg/mL dan distirer dengan magnetik *stirrer* selama 4-5 jam (Alam *dkk.*, 2015). Hasil sentrifugasi yang terbentuk kemudian dilakukan pengeringan dengan menggunakan *hotplate* dan *dioven* pada suhu 40 °C selama 6-8 jam hingga diperoleh bentuk serbuk. Hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 1B.

Karakterisasi dan Instrumentasi

Hasil sintesis selanjutnya dikarakterisasi menggunakan XRD, SEM-EDX dan FT-IR.

Karakterisasi nanopartikel dengan *X-Ray Difraction* (XRD) yaitu sampel yang akan dianalisis dimasukkan kedalam plat aluminium ukuran 2x2 cm, plat aluminium yang berisi sampel di karakterisasi menggunakan XRD dengan sumber Cu-K α mengatur panjang gelombang serta sudut difraksi 2θ . Untuk interpretasi grafik menggunakan bantuan *software Match*.

Karakterisasi dengan menggunakan Spektrofotometer FT-IR. Struktur kimia sampel dapat diketahui melalui Spektroskopi *Fourier-Transform Infrared* (FT-IR) dilakukan dengan mencampur 2 mg sampel dengan 200 mg medium KBr

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

dan diubah menjadi pelet transparan. Spektra FT-IR direkam menggunakan panjang gelombang $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (Garg & Garg, 2018).

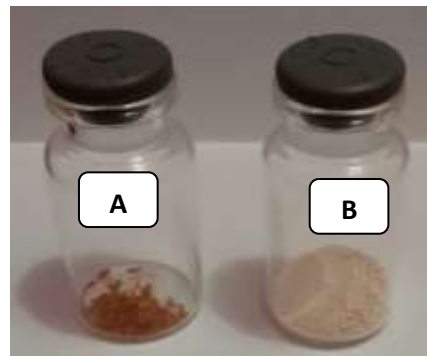
Karakterisasi nanopartikel dengan menggunakan instrumen SEM-EDX yaitu menyiapkan alat dan bahan, kemudian sampel dimasukkan pada alat *coating* (pelapisan) dan selanjutnya dimasukkan ke dalam SEM untuk dilakukan analisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Sintesis

Nanopartikel yang terdapat pada obat-obatan kemoterapi bertujuan untuk meningkatkan *bioavailabilitas*, sistem pengiriman obat (*distribusi obat/drug delivery*), memperbaiki target obat dan *release* obat ke sel kanker. Sehingga diharapkan dapat meningkatkan efikasi dan mengurangi efek samping (Artini, 2013). BSA memiliki berat molekul 69,323 Da, pH isoelektrik sebesar 4,7 pada suhu 25 °C. Secara luas BSA digunakan untuk pengiriman obat (*drug delivery*) karena status medisnya, biaya murah, mudah untuk dimurnikan dan sifat yang dimiliki dapat diterima dalam industri biomedis (Nosrati *dkk.*, 2018).

Preparasi nanopartikel BSA dilakukan dengan metode desolvasi. Kelarutan BSA dalam air tinggi jika ditambahkan *desolvating agent*/pelarut pendesolvasi seperti (etanol, aseton, dan DMSO) sehingga membentuk agregat dari BSA dan ditambahkan gluteraldehid sebagai *crosslinker* yang didasarkan pada karakteristik fisiko kimia. Asam folat (mengandung protein) berfungsi untuk mengoptimalkan sistem pengiriman obat (Ambarwati, 2019).



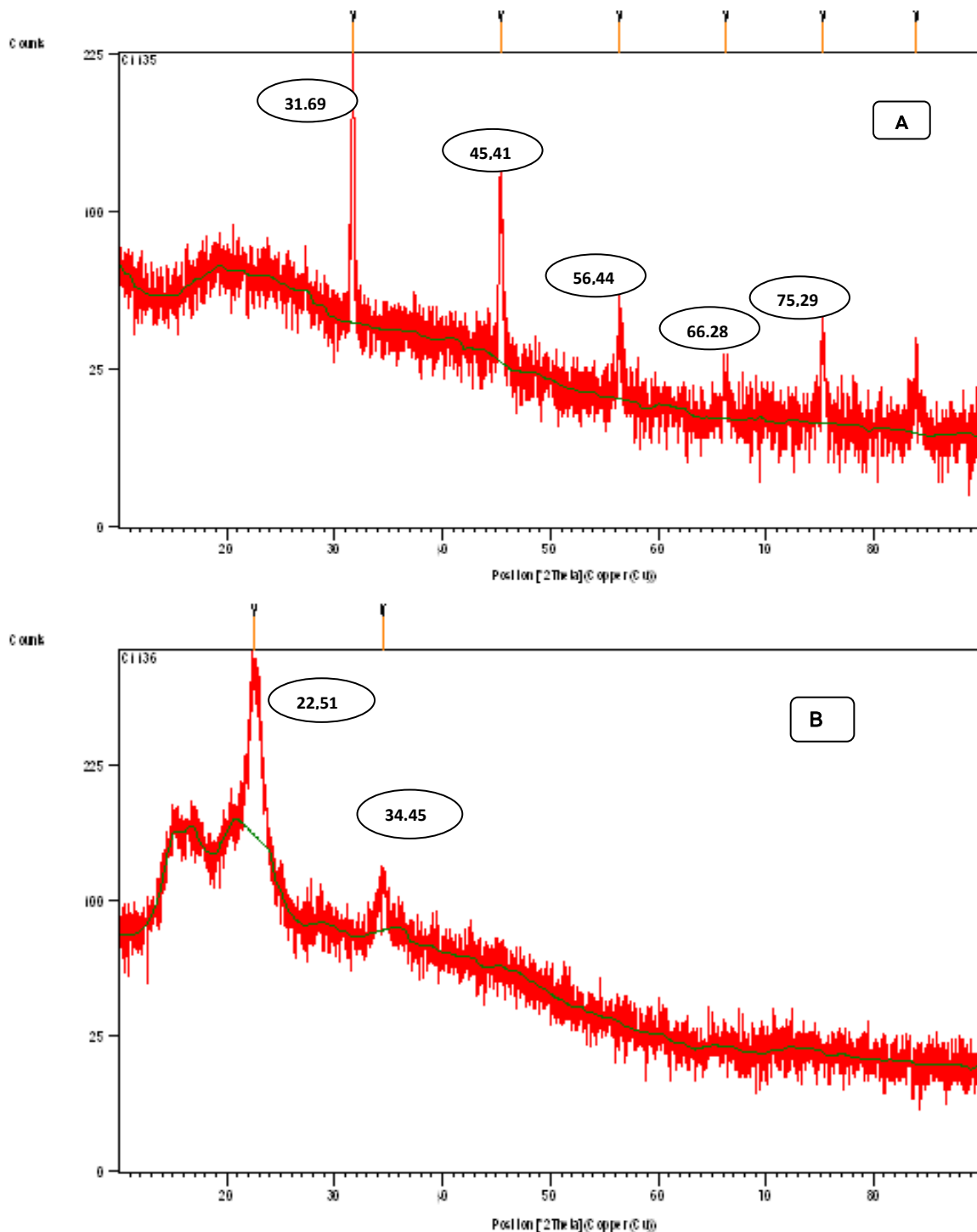
Gambar 1. A. Hasil Sintesis NP-BSA, B. Hasil Sintesis As-CP-NP-BSA

Karakterisasi XRD

Karakterisasi nanopartikel NP-BSA dengan nanopartikel As-CP-NP-BSA dilakukan dengan menggunakan instrumen XRD. Tujuan analisis XRD adalah untuk mengetahui karakteristik kristal nanopartikel yang telah disintesis dan menganalisis indeks kristalin. Pengindeks diartikan sebagai penentuan dimensi sel unit melalui posisi *peak* yang dihasilkan. Analisis XRD pada penelitian ini menggunakan sudut difraksi 2θ dengan sudut $10^{\circ}\text{-}90^{\circ}$ untuk semua jenis sampel (Kumaran *dkk.*, 2017). Spektrum difraksi XRD untuk sampel NP-BSA dan As-CP-NP-BSA dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil dari difraktogram puncak XRD pada NP-BSA 2θ muncul *peak* $31,69^{\circ}$; $45,41^{\circ}$; $56,44^{\circ}$; $66,28^{\circ}$ dan $75,29^{\circ}$. Sedangkan hasil difraktogram puncak XRD pada As-CP-NP-BSA yaitu 2θ muncul *peak* $22,51^{\circ}$ dan $34,45^{\circ}$. Hasil difraktogram terdapat pergeseran *peak* antara NP-BSA dan As-CP-NP-BSA dikarenakan kristal nanopartikel yang diperoleh dari sintesis belum murni (Kasim *dkk.*, 2020). Perbedaan *peak* NP-BSA dan As-CP-NP-BSA karena komponen yang berbeda. Pada hasil sintesis As-CP-NP-BSA ada penambahan asam folat, obat cisplatin dan *crosslinker* gluteraldehid.

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker



Gambar 2. Spektrum pola difraksi XRD A) NP-BSA, B) As-CP-NP-BSA

Berdasarkan analisis XRD dengan *software Match* menunjukkan bahwa hasil sintesis termasuk dalam nanopartikel dengan ukuran nanopartikel NP-BSA sebesar 2,38 nm dan As-CP-NP-BSA sebesar 2,62 nm. Untuk detailnya dapat dilihat pada Tabel 1.

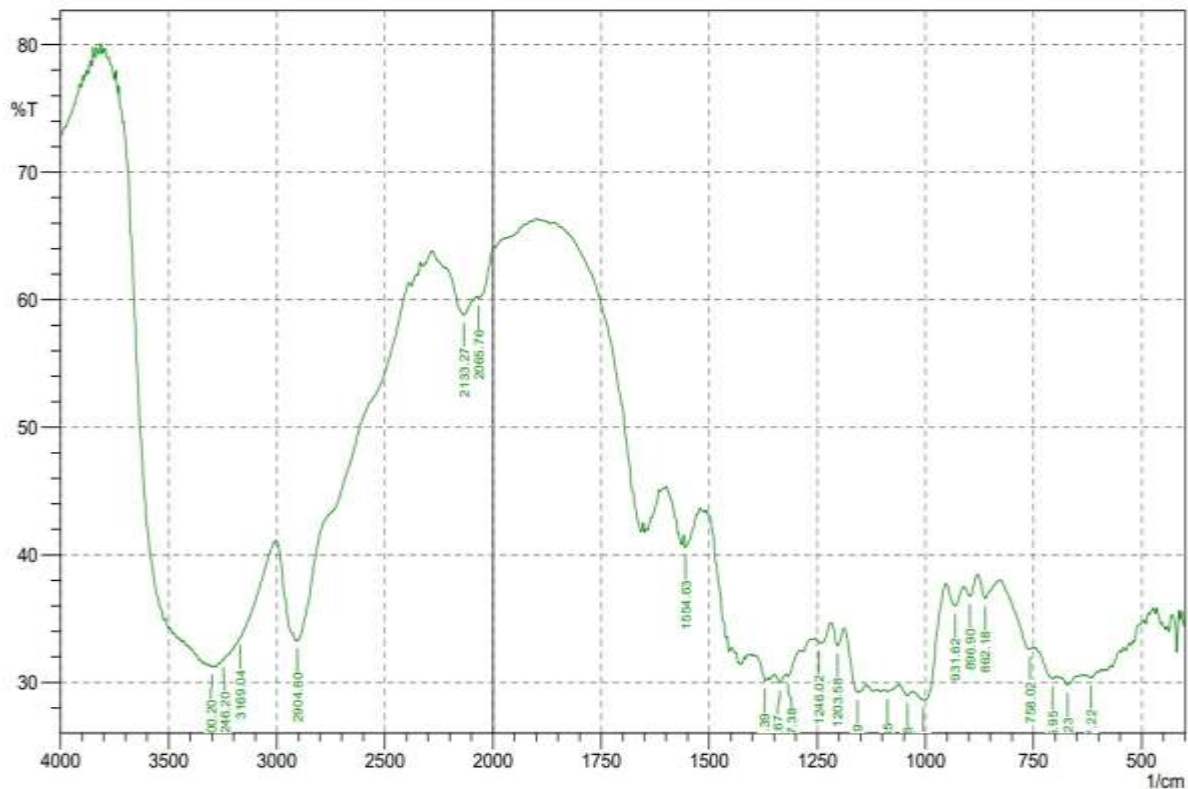
Karakterisasi FT-IR

Analisis FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam hasil sintesis nanopartikel As-CP-NP-BSA. Profil spektrum FT-IR As-CP-NP-BSA dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 2.

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

Tabel 1. Hasil Analisis Ukuran kristal As-CP-NP-BSA

Sampel	2θ	d spacing (Å)	FWHM	Ukuran Kristal
NP-BSA	31,69	2,82283	0,2755	2,38 nm
	45,41	1,99730	0,3542	2,38 nm
	56,44	1,63014	0,3149	2,38 nm
	66,28	1,41020	0,4723	2,38 nm
	75,29	1,26217	0,3936	2,38 nm
As-CP-NP-BSA	22,5169	3,94877	0,5510	2,62 nm
	34,4457	2,60300	0,6298	2,62 nm



Gambar 3. Hasil FT-IR As-CP-NP-BSA

Tabel 2. Spektrum FT-IR Nanopartikel As-CP-NP-BSA

Bilangan Gelombang Nanopartikel As-CP-NP-BSA (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3169	C-H Aromatik
671-931	C-H Alkena
1041-1317	C-O Alkohol/Eter/Asam Karboksilat/Ester
1317 dan 1554	NO ₂
1554	C=C Cincin Aromatik
2133	C=C Alkuna
1336-1371	C-H Alkana
2065	C-O
2904	C-H
3246-3300	O-H Alkohol

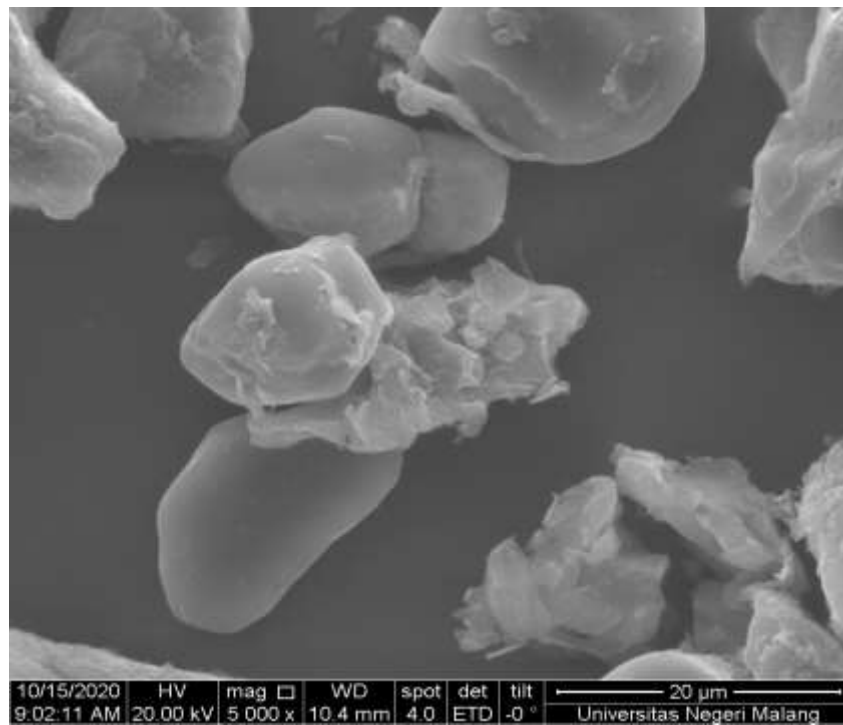
Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

Morfologi Kristal dengan SEM-EDX

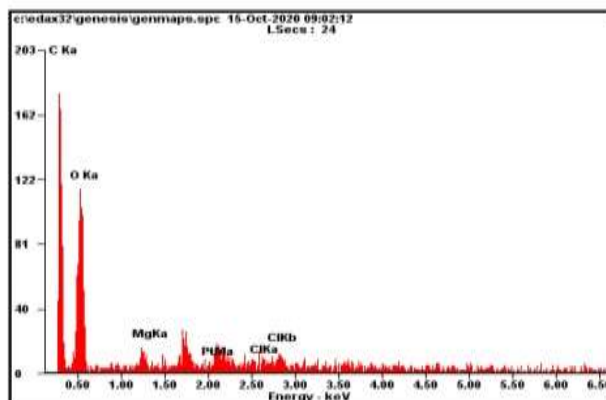
Nanopartikel memiliki bentuk dan ukuran yang beragam (Masakke *dkk.*, 2015). Salah satu analisis yang digunakan untuk menunjukkan morfologi suatu kristal yaitu dengan analisis SEM. Analisis SEM menggunakan objek yang diamati secara 3D untuk mengukur ketebalan sampel. Sedangkan EDX digunakan untuk mengetahui komposisi unsur kimia dari material suatu sampel.

Hasil analisis SEM-EDX nanopartikel As-CP-NP-BSA dengan

perbesaran 5000x dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil analisis Morfologi nanopartikel dengan SEM menunjukkan bahwa nanopartikel memiliki bentuk dan ukuran yang beragam. Ukuran yang beragam diakibatkan oleh efek agregasi nanopartikel dan adanya partikel yang tidak seragam (Kasim *dkk.*, 2020). Ukuran pori sebesar 20 µm dapat dilihat pada Gambar 4. Sedangkan untuk unsur yang ditemukan dalam instrumen SEM-EDX yaitu unsur C, O, Mg, Pt, Cl dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Morfologi nanopartikel As-CP-NP-BSA dengan SEM-EDX



Element	Wt%	At%
CK	52.00	60.41
OK	44.15	38.50
MgK	01.30	00.75
PtM	02.06	00.15
ClK	00.49	00.19
Matrix	Correction	ZAF

Gambar 5. Unsur dan Komposisi Unsur Hasil Analisis SEM-EDX

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa nanopartikel *bovine serum albumin* (BSA) yang dikombinasi dengan cisplatin dan asam folat telah berhasil disintesis dengan metode desolvasi. Hasil sintesis dikarakterisasi dengan menggunakan FT-IR, XRD dan SEM – EDX. Analisis FT-IR menunjukkan adanya gugus fungsi O-H alkohol, C-H, C-C, NO₂ yang berperan dalam sintesis nanopartikel. Analisis XRD menunjukkan adanya pergeseran peak dari NP-BSA 31,69 dan As-CP-NP-BSA 34,45, ukuran nanopartikel NP-BSA 2,38 nm dan As-CP-NP-BSA 2,62 nm sedangkan analisis SEM-EDX adanya unsur C, O, Mg, Cl dan Pt. Saran untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan pengujian antikanker secara klinis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh hibah Penelitian Dosen Pemula (PDP), RISTEK-BRIN. Perjanjian/Kontrak Nomor 083/SP2H/LT/DRM/2020; 044/SP2H/LT-MONO/LL7/2020;297.25/UNUSA/AdmL PPM/IV/2020.

DAFTAR RUJUKAN

- Alam, N., Dubey, R. D., Kumar, A., Koul, M., Sharma, N., Sharma, P. R., Chandan, B. K., Singh, S. K., Singh, G., & Gupta, P. N. (2015). Reduced toxicological manifestations of cisplatin following encapsulation in folate grafted albumin nanoparticles. *Life Sciences*, 142, 76–85. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.019
- Aldossary, S. A. (2019). Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(1), 07–15. doi: 10.13005/bpj/1608
- Ambarwati, R. (2019). Pembuatan Nanopartikel Albumin Menggunakan Metode Desolvasi Sebagai Alternatif Sistem Pembawa. *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(1), 35–39. doi: 10.33751/jf.v9i1.1258
- Artini, I. G. A. (2013). Peranan Nanopartikel Dalam Penatalaksanaan Kanker di Era Targeting Therapy. *Indonesian Journal of Cancer*, 7(3), 111–117.
- Dong, Y., Fu, R., Yang, J., Ma, P., Liang, L., Mi, Y., & Fan, D. (2019). Folic acid-modified ginsenoside Rg5-loaded *bovine serum albumin* nanoparticles for targeted cancer therapy in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6971–6988. doi: 10.2147/IJN.S210882
- Garg, S., & Garg, A. (2018). Encapsulation of Curcumin in Silver Nanoparticle for Enhancement of Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(3), 1160. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(3).1160-66
- Kashyap, D., Tuli, H. S., Yerer, M. B., Sharma, A., Sak, K., Srivastava, S., Pandey, A., Garg, V. K., Sethi, G., & Bishayee, A. (2019). Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Seminars in Cancer Biology*, June, 1–19. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.014
- Kasim, S., Taba, P., Ruslan, & Anto, R. (2020). Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Ekstrak Daun Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) Sebagai Bioreduktor. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 6(2), 126–133. doi: 10.22487/kovalen.2020.v6.i2.15137
- Kementerian Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan. (2018). Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar, 1–100. <http://www.depkes.go.id/resources/download/info-terkini/hasil-risikesdas-2018.pdf>

Sintesis Nanopartikel *Bovine Serum Albumin* Kombinasi Cisplatin dan Asam Folat Sebagai Kandidat Antikanker

- Koo, H., Min, K. H., Lee, S. C., Park, J. H., Park, K., Jeong, S. Y., Choi, K., Kwon, I. C., & Kim, K. (2013). Enhanced drug-loading and therapeutic efficacy of hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for tumor-targeted paclitaxel delivery. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 823–831. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.297
- Kumaran, P., Gupta, A., & Sharma, S. (2017). Synthesis of wound-healing keratin hydrogels using chicken feathers proteins and its properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 171–178. doi: 10.22159/ijpps.2017v9i2.15620
- Masakke, Y., Sulfikar, & Rasyid, M. (2015). Biosintesis Partikel-nano Perak Menggunakan Ekstrak Metanol Daun Manggis (*Garcinia mangostana* L .) Biosynthesis of Silver Nanoparticles using Methanol Extract of Mangosteen Leaves (*Garcinia mangostana* L .). *Jurnal Sainsmat*, IV(1), 28–41.
- Mutiah, R., Suryadinata, A., & Nurani, P. S. (2018). Uji Sitotoksitas Kombinasi Cisplatin Dengan Ekstrak Etanol Benalu Alpukat (*Dendrophthoe pentandra* (L) Miq.) Pada Sel Hela. *Majalah Kesehatan*, 5(3), 133–143. doi: 10.21776/ub.majalahkesehatan.005.03.2
- Nosrati, H., Abbasi, R., Charmi, J., Rakhshbahar, A., Aliakbarzadeh, F., Danafar, H., & Davaran, S. (2018). Folic acid conjugated bovine serum albumin: An efficient smart and tumor targeted biomacromolecule for inhibition folate receptor positive cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 1125–1132. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.026
- Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., & Wang, F. (2019). Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chemical Research in Toxicology*, 32(8), 1469–1486. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00204
- Rahmani, A. H., Al Zohairy, M. A., Aly, S. M., & Khan, M. A. (2014). Curcumin: A Potential Candidate in Prevention of Cancer via Modulation of Molecular Pathways. *BioMed Research International*, 2014, 761608. doi: 10.1155/2014/761608

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

Detection and Identification of Flavonoids from Majapahit (Crescentia cujete) Stem Bark Ethanolic Extract Using LCMS

Fatimah^{1a*)}, Rahma Diyan Martha^{1b)}, Asmarani Kusumawati²⁾

^{1a)}STIKes Karya Putra Bangsa, D3 Analis Kesehatan, Indonesia

^{1b)}STIKes Karya Putra Bangsa, S1 Farmasi, Indonesia

²⁾Universitas Gadjah Mada, Kedokteran Hewan, Indonesia

*email: fatimbiotech@gmail.com

Received: 22/10/20; Revised: 11/12/20; Accepted: 11/12/20

Abstrak

Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan salah satu tanaman yang banyak tersebar di Indonesia. Namun, tanaman ini kurang mendapatkan perhatian, karena kurangnya informasi mengenai potensi tanaman tersebut. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa terbesar yang terdapat pada tanaman yang memiliki beberapa fungsi farmakologis dan medisinal, salah satunya anti kanker. Dalam penelitian ini, dilakukan deteksi dan identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit menggunakan LCMS, untuk mengetahui potensi tanaman majapahit sebagai salah satu kandidat tanaman potensial antikanker. Berdasarkan hasil deteksi menggunakan LCMS diketahui terdapat sekitar 88 senyawa yang terdeteksi, termasuk didalamnya 12 senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang ditemukan, yaitu; *acetoin*, *quercetine*, *kaempferol-3-O-rhamnoside*, *acacetin7-rutinoside*, *fortunellin*, *kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) glucoside]*, *didymin*, *diosmin*, *hesperidin*, *rutin*, *narirutin 4'-glucoside*, *kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) glucoside]-7-glucoside*. *Kaempferol-3-O-rhamnoside* merupakan flavonoid dengan komposisi terbesar yakni, sebesar 4,072%. Keseluruhan flavonoid yang teridentifikasi memiliki potensi sebagai antikanker, kecuali *acetoin* dan *fortunellin*.

Kata kunci: antikanker; *Crescentia cujete*; ekstrak etanol; flavonoid; LCMS

Abstract

Majapahit (Crescentia cujete) is a plant that widely spread in Indonesia. However, this plant has received less attention, because the lack of information regarding its potential. Flavonoids are one of the largest compounds found in plants. Flavonoids are known to have several pharmacological and medicinal functions, one of which is anti-cancer. In this study, the detection and identification of flavonoids in ethanolic extract of Majapahit stem bark were carried out using LCMS, to determine the potential of the Majapahit plant as an anticancer. Based on the result of LCMS detection, it was known that there were 88 compounds detected, including 12 flavonoids compounds. The flavonoids compound that identified, such as acetoin, quercetin, kaempferol-3-O-rhamnoside, acacetin7-rutinoside, fortunellin, kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy -3-methylglutaryl) glucoside], didymin, diosmin, hesperidin, rutin, narirutin 4'-glucoside, kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) glucoside]-7-glucoside. The highest composition was kaempferol-3-O-rhamnoside with 4.072%. All flavonoids that have been identified, was known have potential as an anticancer, except; acetoin and fortunellin.

Keywords: anticancer; *Crescentia cujete*, ethanolic extract; flavonoids; LCMS

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan salah satu jenis kelompok senyawa terbesar yang ditemukan pada tanaman, ada sekitar 10.000 jenis flavonoid yang ditemukan pada tanaman (Weston & Mathesius, 2013). Flavonoid merupakan senyawa yang penting bagi tanaman yaitu berfungsi melindungi tanaman dari serangan jamur parasit, patogen (Kumar & Pandey, 2013), meregulasi faktor pertumbuhan seperti auksin dan melindungi tanaman dari cahaya sinar tampak yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif (Agati *dkk.*, 2012). Pada beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa flavonoid memiliki fungsi farmakologis dan pengobatan, yakni, antioksidan (Zhao *dkk.*, 2017), antivirus (Lalani & Poh, 2020), antidiabetes, *cardioprotective* (Alghazeer *dkk.*, 2018), anti inflamasi (Spagnuolo *dkk.*, 2017), *hepatoprotective* (Zhao *dkk.*, 2017), *gastroprotective* (Mota *dkk.*, 2009), anti *atherosclerosis* (Grassi *dkk.*, 2010), *vasorelaxant* (Woodman *dkk.*, 2005). Flavonoid beserta turunannya juga dimanfaatkan dalam dunia kesehatan untuk terapi kanker.

Bioproduct flavonoid dari tanaman banyak digunakan karena tidak memiliki efek negatif seperti yang terjadi pasca terapi kanker. Flavonoid diketahui memiliki kemampuan antiproliferasi dan sitotoksistas pada sel line kanker. Beberapa mekanisme molekuler yang terjadi setelah pemberian flavonoid pada sel kanker, meliputi; *downregulasi* protein mutan p53, menghambat tirosin kinase (Abotaleb *dkk.*, 2019), menghambat proliferasi sel dan *autophagy* (Zhang *dkk.*, 2018), menghambat *heat shock* protein, kapasitas pengikatan reseptor esterogen, dan menghambat protein Ras (Veeramuthu *dkk.*, 2017).

Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan salah satu tanaman yang banyak tersebar di Indonesia. Tanaman ini merupakan tanaman asli dari amerika selatan (Smith & Dollear, 1947). Di indonesia tanaman ini sering digunakan sebagai tanaman hias. Perlu dilakukan adanya studi lebih lanjut mengenai komponen senyawa, terutama flavonoid yang terdapat pada bagian kulit batang tanaman majapahit agar mampu menggali potensi tanaman majapahit sebagai salah satu tanaman potensial antikanker. Senyawa antikanker yang berasal dari bahan alam diketahui memiliki tingkat toksisitas yang rendah untuk penanganan kanker jika dibandingkan dengan kemoterapi yang sering dilakukan sebagai metode pengobatan kanker (Greenwell & Rahman, 2015).

LCMS merupakan kombinasi dari *Liquid Chromatography* (LC) yang digunakan untuk pemisahan sampel dan dilanjutkan dengan *Mass Spectrometer* (MS) yang mendeteksi muatan ion. Pada penelitian ini menggunakan LCMS untuk deteksi dan identifikasi dikarenakan data yang di peroleh dari LCMS berupa informasi kuantitas dan identitas senyawa spesifik, serta informasi mengenai berat molekul dan struktur senyawa yang teridentifikasi (Saibaba *dkk.*, 2016)

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini menggunakan sampel kulit batang tanaman Majapahit (*C. cujete*) yang didapat dari satu sumber tanaman Majapahit yang tumbuh di halaman STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung. Proses ekstraksi kulit batang tanaman Majapahit (*C. cujete*) menggunakan etanol 96%. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan *rotary*

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

evaporator merk buchi. Kemudian ekstrak dilakukan pengujian kuantitatif untuk mengetahui kadar flavonoid, bahan yang diperlukan meliputi; kuersetin murni, etanol 70%, $AlCl_3$ 2%, dan kalium asetat 120 mM. Uji kuantitatif dilakukan dengan perangkat spektrofotometer merk Biobase. Sampel ekstrak kulit batang tanaman Majapahit juga dilakukan deteksi dan identifikasi senyawa dengan menggunakan LCMS. Proses preparasi sampel dilakukan dengan menggunakan metanol pro analisa kemudian di filtrasi dengan menggunakan filter *cellulose acetate* 0,45 μm . Deteksi dan identifikasi menggunakan perangkat LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) merk Shimadzu.

Ekstraksi Kulit Batang Tanaman Majapahit (*C. cujete*)

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi seperti terlihat pada Gambar 1C. Kulit batang yang sudah dihaluskan diambil sebanyak 100 gram, dan direndam menggunakan etanol 96% pro analisa sebanyak 600 ml. Perendaman dilakukan selama 3 hari. Hasil perendaman kemudian dilakukan penyaringan, sehingga didapatkan ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit. Ekstrak kemudian dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* (ekstrak bebas pelarut) yang dapat dilihat pada Gambar 1D.



Gambar 1. A. Kulit Batang Tanaman Majapahit (*C. cujete*); B. Serbuk Kulit Batang Tanaman Majapahit Kering; C. Proses Maserasi; D. Hasil Maserasi

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

Uji Kuantitatif Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Pengukuran keberadaan flavonoid di dalam sampel ekstrak etanol kulit batang tanaman Majapahit di ketahui dengan melakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebelum melakukan pengujian dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara membaca serapan gelombang kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan rentang panjang gelombang 370-450 nm (Das *dkk.*, 2014). Kemudian dilakukan pembuatan kurva standar kuersetin dengan konsentrasi yang dipakai 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, dan 50 ppm. Dari data pengukuran didapatkan panjang gelombang maksimum 435 nm. Kuersetin umum digunakan sebagai standar dalam pengukuran total flavonoid dalam suatu bahan, karena murah dan mudah diperoleh. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengukur sampel ekstrak etanol kulit batang tanaman Majapahit.

Penentuan flavonoid total dilakukan dengan cara menimbang ekstrak etanol kulit batang tanaman Majapahit sebanyak 206 mg dan di tambahkan dengan etanol 70% sebanyak 206 mL, sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok dipipet 1 mL ditambahkan dengan AlCl₃ 2% sebanyak 1 mL dan kalium asetat 120 mM sebanyak 1 mL, dilanjutkan dengan inkubasi selama 1 jam (Stankovic *dkk.*, 2011). Kemudian sampel yang telah diinkubasi dapat dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 435 nm.

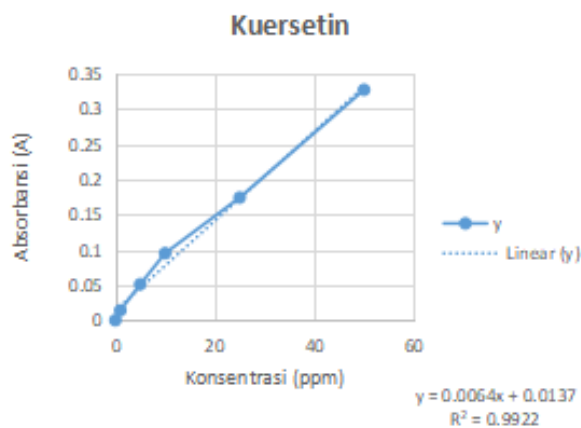
Deteksi dan Identifikasi Senyawa dengan LCMS

Ekstrak bebas pelarut, dilarutkan menggunakan metanol pro analisa hingga konsentrasi 20 ppm, perbandingan sampel 1:5 (2 mg sampel ekstrak : 10 mL metanol). Selanjutnya dilakukan presipitasi protein dengan disaring menggunakan filter *cellulose acetate* 0,45 µm, dan dilanjutkan dengan proses *degassing*. Sampel diambil 1 µL dan diinjeksikan ke dalam sistem instrumen LCMS-8040. Analisis LCMS dilakukan dengan UPLC-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) yang dilengkapi dengan pompa biner. LC (*Liquid Chromatography*) dihubungkan spektrometer massa *Quadrupole Time-of-Flight* (QTOF) dilengkapi dengan sumber ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI). *Mass spectrometry* (MS) yang digunakan, yaitu sistem QTOF dengan mode ionisasi positif. Parameter ESI (*Electrospray Ionization*) yang digunakan meliputi suhu kapiler 350 °C dan gas pengabut 60ML/HR, sumber tegangan 5,0V. Modus full scan dari m/z 100-5000 dilakukan dengan suhu sumber 100 °C. Kolom UPLC yang digunakan Shimadzu Shim *Pack* FC-ODS (2mm x 150mm, 3µm). Eluen yang digunakan adalah metanol 90% dan air. Eluen diatur pada laju aliran total 0,5 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada uji kuantitatif flavonoid dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan panjang gelombang 435 nm. Pada penentuan kurva standar kuersetin, hasil dapat dilihat pada Gambar 2.

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS



Gambar 2. Kurva Standar Kuersetin

Hasil regresi kurva standar (Gambar 2) didapatkan persamaan linier $y = 156,07x - 2,0274$ dengan nilai $R^2 = 0,9922$, sehingga dapat dikatakan bahwa ada korelasi antara nilai konsentrasi dengan nilai absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi, nilai absorbansi juga semakin tinggi. Pada pengukuran konsentrasi total flavonoid pada ekstrak etanol kulit batang sebanyak 206 mg yang menggunakan panjang gelombang 435 nm, diperoleh flavonoid total sebanyak 99,097 mgQE/g. Flavonoid diketahui terakumulasi pada sel bagian epidermis atas dan bawah, *paerenkim palisade*, serta pada stomata (Tattini *dkk.*, 2000). Selain pada daun, flavonoid juga dapat ditemukan pada buah, biji-bijian, kulit pohon, akar, batang, dan bunga (Panche *dkk.*, 2016).

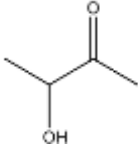
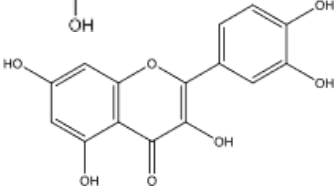
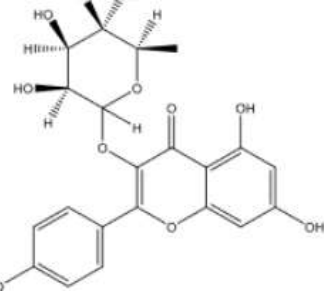
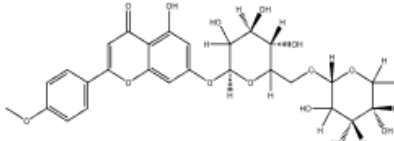
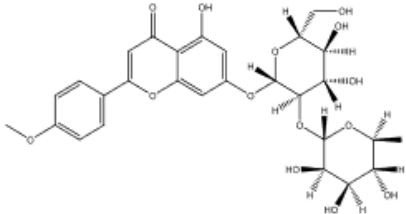
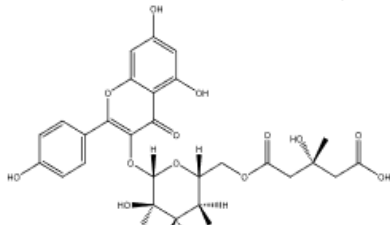
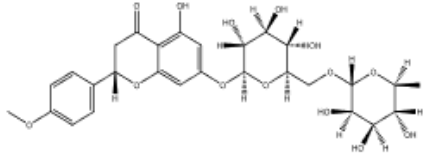
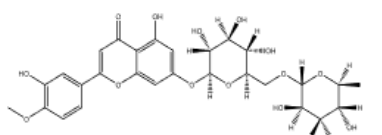
Hasil identifikasi menggunakan LCMS diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit sebanyak 88 senyawa. Senyawa yang teridentifikasi diduga senyawa golongan flavonoid berjumlah 12 senyawa antara lain *acetoin*, *quercetine*, *kaempferol-3-O-rhamnoside*, *acacetin 7- rutinoside*, *fortunellin*, *kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]*, *didymin*, *diosmin*, *hesperidin*, *rutin*, *narirutin 4'-*

glucoside, *kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methyl glutaryl) glucoside]-7-glucoside*. Hasil identifikasi LCMS dapat dilihat pada Tabel 1.

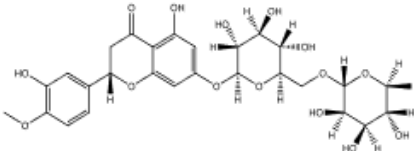
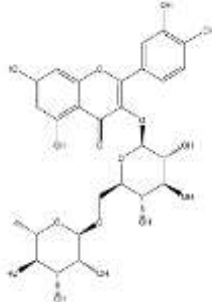
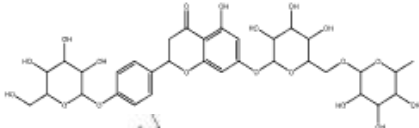
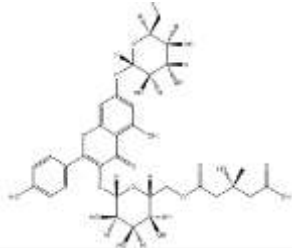
Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan karena flavonoid bertindak sebagai *free radical scavengers* dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Atom hidrogen yang dilepaskan mampu berikatan dengan radikal bebas, hingga bermuatan netral. Flavonoid yang kehilangan atom hidrogen kemudian mengalami resonansi dari gugus hidroksil yang menyebabkan energi aktivitasnya berkurang dan tetap stabil. Radikal bebas yang sudah distabilkan akan berhenti melakukan reaksi berantai sehingga mencegah terjadinya kerusakan lipid, protein, atau DNA (Diab *dkk.*, 2012).

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa senyawa flavonoid dengan jumlah komposisi tertinggi dari ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit adalah *kaempferol-3-O-rhamnoside* sebesar 4,07%, yang muncul pada waktu retensi menit ke 21,429. Senyawa flavonoid yang terdeteksi diketahui memiliki kemampuan medisinal dan farmakologis. *Kaempferol-3-O-rhamnoside* pada ekstrak daun *Schima wallichii Korth* diketahui mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dan menginduksi terjadinya apoptosis dengan cara mengaktifasi *signaling caspase* secara *cascade* (Diantini *dkk.*, 2012).

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS**Tabel 1.** Hasil Deteksi Dan Identifikasi Senyawa flavonoid Menggunakan LCMS

Senyawa	Waktu retensi (Rt)	Komposisi (%)	Analisis	Struktur
<i>Acetoin</i>	1,059	0,346	Rumus kimia: C ₄ H ₈ O ₂ Berat molekul: 88,0524 m/z : 88,0524 (100%)	
<i>Quercetine</i>	11,427	2,054	Rumus kimia: C ₁₅ H ₁₀ O ₇ Berat molekul: 302,0427 m/z : 302,0427 (100%)	
<i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	21,429	4,072	Rumus kimia: C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ Berat molekul: 432,1056 m/z : 432,1056 (100%)	
<i>Acacetin-7-rutinoside</i>	33,702	2,812	Rumus kimia: C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄ Berat molekul : 592,5500 m/z : 592,1792 (100%)	
<i>Fortunellin</i>	33,722	1,763	Rumus kimia : C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄ Berat molekul : 592,1792 m/z : 592,1792 (100%)	
<i>Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]</i>	33,729	3,328	Rumus kimia : C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅ Berat molekul : 592,5060 m/z : 592,1428(100%)	
<i>Didymin</i>	34,004	1,778	Rumus kimia : C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄ Berat molekul : 592,5060 m/z : 592,1428(100%)	
<i>Diosmin</i>	35,504	1,922	Rumus kimia : C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ Berat molekul : 608,5490 m/z : 608,5490 (100%)	

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

Senyawa	Waktu retensi (Rt)	Komposisi (%)	Analisis	Struktur
<i>Hesperidin</i>	35,507	3,937	Rumus kimia : C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅ Berat molekul : 610,5650 m/z : 610,1741 (100%)	
<i>Rutin</i>	35,517	3,580	Rumus kimia : C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ Berat molekul : 610,1534 m/z : 610,1534 (100%)	
<i>Narirutin 4'-glucoside</i>	46,301	2,305	Rumus kimia : C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉ Berat molekul : 742,2320 m/z : 742,2320 (100%)	
<i>Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]-7-glucoside</i>	46,564	2,713	Rumus kimia : C ₃₃ H ₃₈ O ₂₀ Berat molekul : 754,6470 m/z : 754,1956 (100%)	

Hesperidin mampu menginduksi apoptosis pada sel *pleural mesothelioma* MSTO-211H dengan cara menghambat protein Sp 1 (Lee *dkk.*, 2012). Selain *mesothelioma*, *hesperidin* juga mampu menginduksi apoptosis pada kanker *gastric*, kanker kolon, kanker payudara, kanker paru, dan kanker hati (Devi *dkk.*, 2015).

Rutin diketahui memiliki kemampuan sebagai antikanker. Pada sel *line* kanker paru (A549) dan kolon (HT29 dan Caco-2) diketahui mampu mengurangi penempelan dan migrasi sel, yang mengakibatkan proliferasi terhambat dan menurunkan produksi ROS (Sghaier *dkk.*, 2016).

Kaempferol merupakan aglikon flavonoid yang banyak ditemui dalam bentuk glikosida. *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-*

methylglutaryl)glucoside] dan *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) glucoside] -7-glucoside* termasuk derivat dari senyawa *kaempferol* yang mengalami glikosilasi (Imran *dkk.*, 2019). *Kaempferol* dan derivatnya yang mengalami glikosilasi diketahui memiliki potensi sebagai anti kanker, diantaranya; menghambat proliferasi pada *hepatocarcinoma*, menghambat migrasi dan pertumbuhan pada sel glioblastoma kanker otak, menghambat pertumbuhan sel kanker payudara, memicu sel untuk terjadi apoptosis pada kanker darah (Imran *dkk.*, 2019).

Acacetin7-rutinoside (linarin) diketahui memiliki kemampuan sebagai anti kanker, yakni mampu menginduksi apoptosis pada sel *line* kanker prostat

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

manusia LNCaP dan DU145 (Singh *dkk.*, 2005). Narirutin, Narirutin 4'-glucoside, dan beberapa komponen flavonoid yang terdapat pada kulit buah jeruk mampu menghambat proliferasi sel line leukemia HL-60 (Diab *dkk.*, 2015).

Quercetin diketahui memiliki efek kemopreventif pada kanker prostat (Yang *dkk.*, 2015). *Quercetin* juga mampu menghambat pertumbuhan sel dan apoptosis pada sel kanker kolon SW4 80 dan HT-29 dengan cara memediasi kemampuan untuk *down* regulasi signaling ErbB2/Erb3 dan jalur Akt. Pada kanker gastrointestinal *quercetin* bekerja sebagai agen anti metastasis dengan cara; mengganggu sistem UPA/UPAR, AMPK α , NF- κ B, ERK1/2, dan regulasi PKC- δ (Kim *dkk.*, 2005; Araujo *dkk.*, 2011).

Diosmin diketahui memiliki aktifitas proapoptosis dan merupakan senyawa potensial yang bersifat genotoksik pada sel line kanker prostat DU145 (Lewinska *dkk.*, 2015). *Diosmin* mampu menekan proliferasi dan viabilitas kultur sel hepatokarsinoma HepG2 (Perumal & Langeswaran, 2019). *Didymin* mampu membunuh p-53 wild type dan drug resistant p-53 mutan pada kultur sel neuroblastoma (Singhal *dkk.*, 2016).

Komponen senyawa flavonoid pada ekstrak etanol kulit batang tanaman Majapahit (*C. cujete*) secara garis besar memiliki potensi sebagai anti kanker. Dari senyawa yang teridentifikasi, hanya senyawa *acetoin* dan *fortunellin* yang belum diketahui potensinya sebagai antikanker. *Acetoin* diketahui digunakan sebagai bahan aditif pada makanan, yakni meningkatkan cita rasa pada makanan (Xiao & Jian, 2014). *Fortunellin* diketahui memiliki kemampuan untuk melindungi jantung dari kerusakan yang diakibatkan karena diabetes, dengan cara menekan

inflamasi dan stress oksidatif (Zhao, 2017). *Fortunellin* juga mampu menurunkan inflamasi dan menjaga fungsi *intestinal barrier* pada colitis (Xiong *dkk.*, 2018). Meskipun memiliki kemampuan antiinflamasi, *fortunellin* belum diketahui potensinya sebagai antikanker.

KESIMPULAN

Berdasarkan deteksi dengan menggunakan LCMS, terdapat 12 jenis senyawa flavonoid yang terkandung pada kulit batang tanaman Majapahit (*C. cujete*). Dari 12 senyawa, diketahui 10 senyawa memiliki potensi sebagai antikanker. Berdasarkan hal tersebut, perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek anti proliferasi dan toksisitas tanaman Majapahit agar dapat digunakan sebagai salah satu kandidat untuk terapi kanker.

DAFTAR RUJUKAN

- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., & Busselberg, D. (2019). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancer*, 11(1), 28-66, doi: 10.3390/cancers11010028
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. & Tattini, M. (2012). Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Science*, 196(2012), 67-76, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014
- Alghazeer, R., Elgahmasi, S., Elnfati, A, H., Elhensheri, M., Al-Griw, M. A., Awayn, N. & El-Nami, M. (2018). Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of Flavonoids from *Arbutus pavarii* Against CCl₄ Induced Hepatic Damage. *Biotechnology Journal International*, 21(1), 1-12, doi: 10.9734/BJI/2018/39528
- Araujo, J. R., Goncalvez, P. & Martel, F. (2011). Chemopreventive Effect of Dietary Polyphenols in Colorectal

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

- Cancer Cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77-87, doi: 10.1016/j.nutres.2011.01.006
- Das, N., Islam, M. E., Jahan, N., Islam, M. S., Khan, A., Islam, M. R. & Parvin, M. S. (2014). Antioxidant Activities of Ethanol Extracts and Fractions of *Crescentia cujete* Leaves and Stembark and The Involvement of Phenolic Compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 45, doi: 10.1186/1472-6882-14-45
- Devi, K. P., Rajavel, T., Nabavi, S. F., Setzer, W. N., Ahmadi, A., Mansouri, K., & Nabavi, S. M. (2015). Hesperidin: A Promising Anticancer Agent. *Industrial Crops and Products*, 6(2015), 582-589, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.051
- Diab, K. A. E., Shafik, R. E. S. & Yasuda, S. (2015). In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Novel Orange Peel Extract and It's Fractions on Leukemia HL-60 Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(16), 7053-7060, doi: 10.7314/apjcp.2015.16.16.7053
- Diab, Y., Atalla, K. & Elbanna, K., (2012). Antimicrobial Screening of Some Egyptian Plants and Active Flavones from *Lagerstroemia indica* Leaves. *Drug Discovery Therapeutic*, 6(4), 212-217, doi: 10.5582/ddt.2012.v6.4.212
- Diantini, A., Subarnas, A., Lestari, K., Halimah, E., Susilawati, Y., Supriyatna., Julaeha, E., Achmad, T. H., Suradji, E. W., Yamazaki, C., Kobayashi, K., & Abdullah, R. (2011). Kaempferol-3-O-rhamnoside Isolated From The Leaves of *Schima wallichii* Korth. Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation Through Activation of The Caspase Cascade Pathway. *Oncology Letters*, 3(2012), 1069-1072, doi: 10.3892/ol.2012.596
- Grassi, D., Desideri, G. & Ferri, C. (2010). Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*, 2(8), 889-902, doi: 10.3390/nu2080889
- Greenwell, M. & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(4), 4103-4112, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T. A. Saeed, F., S., Imran, A., Shahbaz, M., Fokou, P. V. T., Arshad, M. U., Khan, H., Guerreiro, S. G., Matrins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*, 24(12), 2277-2283, doi:10.3390/molecules24122277
- Kim, W. K., Bang, M. H., Kim, E. S., Kang, N. E., Jung, K. C., Cho, H. J. & Park, J. H. Y. (2005). Quercetin Decreases The Expression of ErbB2 and ErbB3 Proteins in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(3), 155-162, doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.10.010
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013(29), 1-16, doi: 10.1155/2013/162750
- Lalani, S., & Poh, C. L. (2020). Flavonoids as Antiviral Agents for Enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses*, 12(2), 184-219, doi:10.3390/v12020184
- Lee, K-A., Lee, S-H., Lee, Y-J., Baeg, S. M. & Shim, J-H. (2012). Hesperidin Induces Apoptosis by Inhibiting Sp1 and Its Regulatory Protein MSTO-211H Cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(3), 273-279, doi: 10.4062/biomolther.2012.20.3.273
- Lewinska, A., Siwak, J., Rzeszutek, I. & Wnuk, M. (2015). Diosmin Induces Genotoxicity and Apoptosis in

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

- DU145 Prostate Cancer Cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(3), 417-425, doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.005
- Mota, K. S. D. L., Dias, G. E. N., Pinto, M. E. F., Luiz-Ferreira, A., Souza-Brito, A. R. M., Hiruma-Lima, C. A., Barbosa-Filho, J. M., & Batista, L. M. B. (2009). Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules*, 14(3), 979-1012, doi: 10.3390/molecules14030979
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An Overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1-15, doi:10.1017/jns.2016.41
- Perumal, S & Langeswaran, K. (2019). Diosmin Anti-Tumor Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma. *Biomedical Research*, 30(6), 1-10.
- Saibaba, S. V., Kumar, M. S., & Shanmuga, P. (2016). Mini Review on LC/MS Techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(4), 2381-2395
- Sghaier, M. B., Pagano, A., Mousslim, M., Ammari, Y., Kovacic, H. & Luis, J. (2016). Rutin Inhibits Proliferation, Attenuates Superoxide Production and Decreases Adhesion and Migration of Human Cancerous Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84(2016), 1972-1978, doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.001
- Singh, R. P., Agrawal, P., Yim, D., Agarwal, C. & Agarwal, R. (2005). Acacetin Inhibits Cell Growth and Cell Progression, and Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Structure-Activity Relationship with Linarin and Linarin Acetate. *Carcinogenesis*, 26(4), 845-854, doi: 10.1093/carcin/bgi014
- Singhal, S. S., Singhal, S., Singhal, P., Singhal, J., Horne, D. & Awasthi, S. (2017). Didymin: An Orally Active Citrus Flavonoid for Targeting Neuroblastoma. *Oncotarget*, 8(17), 29428-29441, doi: 10.18632/oncotarget.15204
- Smith, B. A & Dollear, F. G. (1947). Oil From Calabash Seed, *Crescentia cujete*, L. *The Journal of The American Oil Chemist Society*, 24(2), 52-54, doi: 10.1007/BF02642127
- Spagnuolo, C., Moccia, S. & Russo, G. L. (2017). Anti-inflammatory Effects of Flavonoids in Neurodegenerative Disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153(30), 105-115, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.09.001
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., & Slavica, S. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity of The Whole Plant and Plant Extracts From *Teucrium Montanum* L. var *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichen B. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 25(1), 2222-2227, doi: 10.5504/BBEQ.2011.0020
- Tattini, M., Gravanno, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., & Romani, A. (2000). Flavonoids Accumulate in Leaves and Glandular Trichomes of *Phillyrea latifolia* Exposed to Excess Solar Radiation. *New Phytologist*, 148(1), 69-77, doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00743.x
- Veeramuthu, D., Raja, W. T. R., Al-Dhabi, N. A., & Savarimuthu, I. (2017). *Flavonoids: Anticancer Properties. Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health, Edited by Gonçalo Justino. Chapter 13*, Croatia: InTech. doi: 10.5772/68095
- Weston, L. A., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis, and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 283-297, doi: 10.1007/s10886-013-0248-5
- Woodman, O. L., Meeker, W. F. & Boujaoude, M. (2005). Vasorelaxant and Antioxidant Activity of Flavonols and Flavones: Structure Activity Relationship. *Journal*

Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS

-
- Cardiovascular Pharmacology*, 46(3), 302-309, doi: 10.1097/01.fjc.0000175431.62626.07
- Xiao, Z & Lu, J. R. (2014). Generation of Acetoin and Its Derivatives in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6487-6497, doi: 10.1021/jf5013902
- Xiong, Y., Qiu, J., Li, C., Qiu, Y., Guo, L., Liu, Y., Wan, J., Li, Y., Wu, G., Wang, L., Zhou, Z., Dong, J., Du, C., Chen, D. & Guo, H. (2018). Fortunellin-Induced Modulation of Phosphatase and Tensin Homolog by MicroRNA-374a Decreases Inflammation and Maintains Intestinal Barrier Function in Colitis. *Frontiers in Immunology*, 9(83), 1-11, doi: 10.3389/fimmu.2018.00083
- Yang, F., Song, L., Wang, H., Wang, J., Xu, Z. & Xing, N. (2015). Quercetin in Prostate Cancer: Chemotherapeutic and Chemopreventive Effects, Mechanism and Clinical Application Potential (Review). *Oncology Reports*, 33(6), 2659-2668, doi: 10.3892/or.2015.3886
- Zhang, H-W., Hu, J-J. H., Fu, R-Q., Liu, X., Zhang, Y-H., Li, J., Liu, L., Li, Y-N., Deng, Q., Luo, Q-S., Ouyang, Q. & Gao, N. (2018). Flavonoids Inhibits Cell Proliferation and Induce Apoptosis and Autophagy Through Downregulation of PI3K / AKT /mTOR/p70S6K/ ULK Signaling Pathway in Human Breast Cancer Cells. *Nature*, 2018(8), 11255-11267, doi: 10.1038/s41598-018-29308-7
- Zhao, C., Zhang, Y., Liu, H., Li, P., Zhang, H. & Cheng, G. (2017). Fortunellin protects against high fructose-induced diabetic heart injury in mice by suppressing inflammation and oxidative stress via AMPK/Nrf-2 pathway regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(2), 552-559, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.076

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

Influence of Phenanthrene on Activity of Pseudomonas Putida TI (8) Catabolic Enzyme

Meilisa Rusdiana Surya Efendi^{1*}, Sri Sumarsih², Novia Fajarwati¹

¹Universitas Bojonegoro, Prodi Kimia, Indonesia

²Universitas Airlangga, Prodi Kimia, Indonesia

*email: meilisarudiana11@gmail.com

Received: 02/11/20; Revised: 25/12/20; Accepted: 25/12/20

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh fenantren terhadap aktivitas enzim katabolik pada *Pseudomonas putida* TI (8). Isolat ditumbuhkan pada media Air Mineral Sintetis (AMS) dengan penambahan 1% fenantren. Enzim katabolik diuji aktivitasnya terhadap fenantren. Uji aktivitas enzim ditentukan berdasarkan penurunan absorbansi NADH pada panjang gelombang 340 nm. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah enzim yang membutuhkan 1 μ mol NADH untuk mengoksidasi substrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat dapat tumbuh menggunakan fenantren hingga 10 hari inkubasi. Aktivitas enzim katabolik tertinggi terhadap fenantren pada inkubasi hari ke 8 sebesar 5,391 U/mL. Penambahan 1% hidrokarbon poliaromatik dapat meningkatkan aktivitas enzim sebesar 10 kali, hal ini menunjukkan bahwa enzim katabolik pada *Pseudomonas putida* TI (8) merupakan enzim induktif.

Kata kunci: bakteri hidrokarbonoklastik; enzim katabolik; fenantren; *Pseudomonas putida* TI (8)

Abstract

This research aims to study the influence of phenanthrene on activity of catabolic enzyme from hydrocarbonoclastic bacteria *Pseudomonas putida* TI (8). Isolates were grown on a synthetic mineral water media and 1% phenanthrene. Catabolic enzymes was tested its activity toward phenanthrene. The value of enzyme activity is determined based on a decrease in NADH absorbance at a wavelength of 340 nm. One unit of enzyme activity is expressed as the amount of enzymes which requires 1 μ mole of NADH to oxidize substrates. The research showed that the isolates could be grown using phenanthrene for up to 10 days of incubation. Catabolic enzyme activity is the highest of phenanthrene were achieved at 8 days incubation with 5.391 U/mL. The addition of substrate can increase the enzyme activity up to 10-fold, indicating that the catabolic enzyme from *Pseudomonas putida* TI (8) is an inductive enzymes.

Keywords: catabolic enzyme; hydrocarbonoclastic bacteria; phenanthrene; *Pseudomonas putida* TI (8)

PENDAHULUAN

Fenantren merupakan hidrokarbon yang tergolong dalam *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH). Golongan ini mewakili sekelompok polutan lingkungan yang banyak mengkontaminasi tanah dan sedimen, serta menjadi perhatian akibat efek karsinogenik atau mutagenik (Zam, 2011).

Keberadaan PAH sebagai polutan sering dihasilkan dari kegiatan eksplorasi dan industri pengilangan minyak bumi. Pada pengilangan minyak bumi terdapat produk samping berupa limbah lumpur minyak bumi (*oil sludge*) (Chelyadyn dkk., 2020).

Upaya pengolahan limbah *oil sludge* dapat diatasi dengan metode biologi, fisika

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas putida* TI (8)

atau kimia. Metode secara biologi merupakan metode yang efektif dari segi biaya dan ramah lingkungan. Metode ini memanfaatkan makhluk hidup khususnya mikroorganisme sebagai upaya pembersihan *oil sludge* (Bharali *dkk.*, 2018). Pengolahan secara fisika dan kimia membutuhkan biaya yang mahal dan dapat menimbulkan pencemar baru.

Proses penguraian oleh aktivitas mikroba, yang mengakibatkan transformasi struktur suatu senyawa sehingga terjadi perubahan integritas molekuler atau menguraikan senyawa yang berbahaya menjadi tidak berbahaya bagi lingkungan disebut dengan biodegradasi (Seo, 2009). Dalam proses biodegradasi terjadi konversi dari bahan-bahan kimia yang kompleks menjadi produk-produk yang termineralisasi seperti air (H₂O) dan karbondioksida (CO₂) (Nzila, 2013).

Mikroorganisme yang digunakan dalam proses degradasi hidrokarbon poliaromatik yaitu bakteri gram positif dan gram negatif seperti *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter faecalis tipe II*, *Actinobacillus sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacea*, dan *Pseudomonas pseudomallei* (Kanaly & Harayama, 2000). Secara alami mikroorganisme ini memiliki kemampuan untuk mentranspor, mengikat, mengemulsi dan mendegradasi hidrokarbon (Zam, 2011). *P. putida* TI (8) menghasilkan biosurfaktan seperti hasil penelitian Alami (2010), bahwa *P. putida* TI (8) memiliki produk biosurfaktan sebesar 9,8 g/L. *P. putida* TI (8) memiliki enzim katabolik yang dapat mempengaruhi kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon menjadi senyawa metabolit yang lebih sederhana. Enzim ini merupakan enzim kunci dalam degradasi hidrokarbon aromatik (Yani *dkk.*, 2020). Adanya enzim menjadikan bakteri bisa

mendegradasi polimer hidrokarbon menjadi senyawa yang tidak kompleks sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan energi oleh bakteri. Keberadaan enzim juga berhubungan dengan proses pengambilan substrat oleh bakteri (Olivera & Luengo, 2019).

Beberapa enzim telah dikaitkan dengan biodegradasi hidrokarbon, khususnya PAH. Enzim dioksigenase adalah contoh enzim yang bekerja pada degradasi aerobik hidrokarbon aromatik. Enzim ini awalnya akan mengoksidasi PAH sehingga menghasilkan cis-dihidrodiol yang selanjutnya diubah menjadi senyawa hidroksi seperti katekol dan mengalami pembelahan posisi orto menghasilkan cis-cis asam mukonat dan mengalami pembelahan posisi meta menjadi 2-hidroksi mukonat semi aldehyd, serta beberapa senyawa karboksilat (Grimm & Harwood, 1997; Crawford & Crawford, 1996; Seo, 2009).

Salah satu faktor yang berperan penting dalam degradasi adalah pertumbuhan dan kebutuhan nutrisi untuk menunjang aktivitas mikroorganisme pendegradasi. Berdasarkan studi literatur, *P. putida* TI (8) berpotensi mendegradasi senyawa PAH, tetapi penelitian tentang uji aktivitas enzim katabolik oleh *P. putida* TI (8) terhadap fenantren belum pernah dilakukan, sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh fenantren terhadap aktivitas enzim katabolik pada *P. putida* TI (8). Dalam penelitian ini diamati pertumbuhan *P. putida* TI (8) dalam media yang mengandung fenantren dan uji aktivitas enzimnya terhadap substrat tersebut.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *Pseudomonas putida* TI (8) yang diisolasi dari Tanjung Perak Surabaya dan dilakukan

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

penelitian di Laboratorium mikrobiologi Universitas Airlangga Surabaya.

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *P. Putida* TI (8), media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), fenantren, NADH, *yeast extract*, AMS. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometri UV-VIS, *centrifuge*, neraca analitik, pipet mikro, inkubator, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, dan *shaker incubator*.

Peremajaan Bakteri

Langkah-langkah penelitian ini adalah melakukan peremajaan *P. putida* TI (8) dalam media NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Pertumbuhan *P. putida* TI (8) diukur dalam 20 mL media garam mineral sintetis yang mengandung 1% fenantren dan diinkubasi dengan *shaker* 100 rpm pada suhu 30 °C selama 14 hari. Perlakuan kontrol diukur dalam 20 mL media garam mineral sintetis tanpa penambahan fenantren dan diinkubasi dengan kondisi yang sama sebagai acuan pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri diamati dengan pengukuran turbiditas dari *optical density* (OD) pada 600 nm menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan interval 2 hari (Abbasian *dkk.*, 2015). Pengukuran *optical density* (OD) didasarkan pada pemisahan cahaya dengan panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang ini memiliki warna orange, pemilihan panjang gelombang 600 nm dikarenakan bahan organik lebih mudah menyerap cahaya, sehingga sel mikroorganisme dapat diperkirakan kuantitasnya dengan panjang gelombang ini (Sudarmadji, 1996).

Analisis Biomassa Sel

Sel dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm. Supernatan dipisah untuk uji aktivitas enzim ekstraselular, pelet kemudian diresuspensikan dalam 1 mL buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Pelet lalu disonikasi menggunakan *ultrasonic disintegrator*, dan disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan yang telah bebas sel digunakan untuk uji aktivitas enzim intraselular.

Uji Aktivitas Enzim

Supernatan yang telah bebas sel digunakan untuk uji aktivitas enzim fenantren dioksigenase. Campuran reaksi mengandung buffer Tris-HCl 20 mM; NADH 0,1 mM; dan 2 µL larutan fenantren (1% fenantren dalam 80% DMSO), dan 20 µL enzim sehingga volume total larutan uji adalah 200 µL. Reaksi dimulai dengan penambahan 2 µL larutan substrat ke dalam campuran reaksi. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 detik dan diinkubasi selama 6 menit. Absorbansi campuran diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 340 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan besarnya aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim fenantren dioksigenase dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1 µmol NADH untuk mengoksidasi substrat (Jauhari *dkk.*, 2014; Mishra *dkk.*, 2014; Singh *dkk.*, 2013; Mishra & Singh, 2012).

Analisis Data Uji Aktivitas Enzim

Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya enzim yang membutuhkan 1 µmol NADH untuk mengoksidasi substrat per menit per mL enzim. Besarnya aktivitas enzim ditentukan

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

dari nilai absorbansi yang di dapat setelah pengukuran campuran reaksi enzimatis menggunakan *microplate reader* dengan persamaan (1)

$$\text{Aktivitas enzim} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta A_{340} \times V_e}{A_{340} \times V_s \times t \times l} \dots\dots(1)$$

Dengan:

ΔA_{340} : Selisih absorbansi NADH awal dan absorbansi tes

A_{340} : Absorptivitas molar NADH, sebesar $6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V_e : Volume enzim, sebesar 1 mL

V_s : Volume sampel enzim, sebesar 0,01 mL

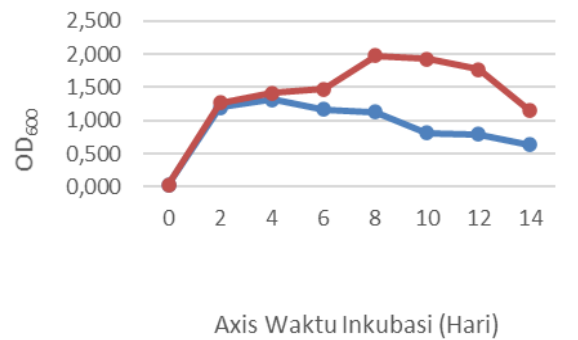
t : Waktu inkubasi, sebesar 5 menit

l : *pathlength*, sebesar 0,05 cm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon pertumbuhan atau *optical density* (OD) *P. putida* TI (8) yang ditumbuhkan dalam media air mineral sintetik (AMS) dengan penambahan substrat fenantren dan tanpa penambahan substrat fenantren disajikan pada Gambar 1. *P. putida* TI (8) dapat menggunakan 1 % substrat hidrokarbon poliaromatik (fenantren) sebagai substrat pertumbuhannya.

P. putida TI (8) pada media AMS tanpa penambahan fenantren dan dengan penambahan substrat fenantren mengalami pertumbuhan sejak hari kedua tanpa didahului fase lag. Pada Gambar 1 terlihat bahwa ada perbedaan pola pertumbuhan *P. putida* TI (8) antara tanpa penambahan substrat hidrokarbon dan penambahan substrat hidrokarbon. Selain itu, biomassa sel tanpa penambahan substrat hidrokarbon lebih sedikit dibandingkan dengan biomassa sel pada penambahan substrat hidrokarbon yang disajikan pada Gambar 2. Hal ini menunjukkan adanya adaptasi dan penggunaan substrat oleh *P. putida* TI (8) untuk tumbuh.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *P. putida* TI (8)



Gambar 2. Kurva Biomassa Sel *P. putida* TI (8)

P. putida TI (8) dapat tumbuh dan beradaptasi dengan adanya fenantren ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) sebagai sumber energi dan sumber karbon. Fase pertumbuhan *P. putida* TI (8) dengan adanya fenantren dapat meningkatkan nilai OD dan massa sel dengan bertambahnya waktu inkubasi dibandingkan dengan tanpa penambahan fenantren. Bakteri dapat mengalami fase stasioner saat sel terhambat karena massa sel mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi dan sel mengalami toksisitas terhadap fenantren serta berkurangnya jumlah oksigen dalam sel (Pelczar, 1986). Selain itu, fase stasioner terjadi karena zat makanan yang diperlukan bakteri berkurang dan hasil ekskresi bakteri dapat tertimbun dalam medium, sehingga mengganggu perkembangbiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya. Kontak langsung antara *P. putida* TI (8) dengan fenantren dapat mempengaruhi bakteri untuk melepaskan enzim yang dibutuhkan oleh bakteri dalam

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

biodegradasi yaitu untuk mengkatalisis reaksi oksidasi pada hidrokarbon (Tuleva *dkk.*, 2005; Alrumman *dkk.*, 2015).

Produksi enzim dioksigenase dilakukan dengan menumbuhkan *P. putida* TI (8) pada media dengan penambahan fenantren dan media tanpa adanya fenantren dengan waktu kultivasi selama 14 hari. Uji aktivitas enzim dioksigenase dari *Pseudomonas putida* TI (8) dilakukan dengan menggunakan ELISA. ELISA adalah salah satu uji serologis yang dapat digunakan untuk mengukur antigen/antibodi. Prinsip utama teknik ELISA adalah penggunaan indikator enzim untuk reaksi imunologi (Wulandari *dkk.*, 2019).



Gambar 3. Aktivitas enzim *P. putida* TI (8) yang ditumbuhkan pada Fenantren

Dari Gambar 3 bisa disimpulkan bahwa fenantren dioksigenase dengan penambahan fenantren mempunyai aktivitas tertinggi saat inkubasi pada hari ke-8 sebesar 5,391 U/mL. Sedangkan aktivitas terendah pada waktu inkubasi hari ke-0, karena belum adanya penggunaan fenantren oleh *P. putida* TI (8) sebagai sumber karbon. Pada hari ke-8 inkubasi terjadi fluktuasi aktivitas enzim yang tinggi karena laju pertumbuhan sel bakteri mencapai titik maksimal dan terjadi pertumbuhan secara logaritmik atau eksponensial.

Dari hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa *P. putida* TI (8) memiliki

aktivitas enzim fenantren dioksigenase. Enzim ini dibutuhkan oleh *P. putida* TI (8) sebagai katalis reaksi oksidasi hidrokarbon untuk mendegradasi fenantren (Kanaly & Harayama, 2000). Adanya enzim ini menjadikan bakteri mampu merubah hidrokarbon menjadi senyawa lebih kecil sehingga dapat dijadikan sebagai sumber makanan oleh bakteri (Devi & Jha, 2020). Bakteri ini dapat merubah dan memecah fenantren menjadi senyawa golongan *catechol* yang digunakan oleh bakteri untuk proses metabolisme asam sitrat (Hamzah *dkk.*, 2011). *P. putida* TI (8) menggunakan fenantren sebagai satu-satunya sumber substrat dan energi sehingga termasuk degradasi asimilatif (Lawal, 2017; Amezcua-Allieri *dkk.*, 2012).

Enzim pada *P. putida* TI (8) berperan dalam proses katabolisme hidrokarbon tahap pertama. Katabolisme adalah reaksi pemecahan senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan menghasilkan energi yang dapat digunakan oleh bakteri untuk melakukan aktivitasnya. Tahap pertama katabolisme aromatik oleh *P. putida* TI (8) masing-masing dikode oleh enzim aromatik dioksigenase. Enzim dioksigenase yang dihasilkan oleh bakteri *P. putida* TI (8) mampu membuka ikatan karbon pada cincin aromatik (fenantren) dan menghasilkan cis-dihidrodiol. Senyawa ini kemudian didehidrogenasi untuk membentuk dihidroksi fenantren yang merupakan substrat untuk enzim melakukan metabolisme. Senyawa tersebut selanjutnya didegradasi menjadi senyawa yang dapat masuk ke dalam siklus krebs, yaitu asam suksinat dan asetil CoA. Asetil CoA akan memasuki siklus asam trikarboksilat di dalam sel bakteri untuk menghasilkan CO₂ dan H₂O serta energi untuk pertumbuhan bakteri *P. putida* TI (8). Fenantren

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

dioksigenase merupakan enzim kunci dalam degradasi hidrokarbon aromatik (Demaneche *dkk.*, 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim katabolik tertinggi terhadap fenantren pada inkubasi hari ke 8 sebesar 5,391 U/mL. Penambahan 1% hidrokarbon poliaromatik dapat meningkatkan aktivitas enzim sebesar 10 kali. Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan deteksi gen penyandi enzim fenantren dioksigenase dari *Pseudomonas putida* TI (8).

DAFTAR PUSTAKA

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 670-699, doi: 10.1007/s12010-015-1603-5

Alami, N. H. (2010). *Efektivitas Biosurfaktan Pseudomonas Putida TI(8) Dalam Bioremediasi Tanah Tercemar Minyak Mentah*. Tesis: Universitas Airlangga. <http://repository.unair.ac.id/38351/>

Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effect of Hydrocarbon Contamination on Soil Microbial Community and Enzyme Activity. *Journal of King Saud University-Science*, 27(1), 31-41, doi: 10.1016/j.jksus.2014.10.001

Amezcuá-Allieri, M. A., Ávila-Chávez, M. A., Trejo, A., & Melendez-Estrada, J. (2012). Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil: A Comparison Between Bioremoval and Supercritical Fluids Extraction. *Chemosphere*, 86(10), 985–993, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.032

Bharali, P., Singh, S. P, Bashir, Y., Dutta, N., Konwar, B. K, & Singh, C. B. (2018). Characterization and Assessment of

Biosurfactant Producing Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacteria: Potential Application in Bioremediation. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 17(2), 103-114, doi: 10.2478/nbec-2018-0011

Chelyadyn, V. L., Bogoslavets, M. M., Chelyadyn, L. I., Poznyak, O. R., & Novosad, P. V. (2020). Sludge of Oil Refining Units and Their Processing. *Journal of Ecological Engineering*, 21(7), 169-177, doi: 10.12911/22998993/125556

Crawford, R. L., & Crawford, D. L. (1996). *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Demaneche, S., Meyer C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., & Jouanneau, Y. (2004). Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain that Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6714-6725, doi: 10.1128/AEM.70.11.6714-6725.2004

Devi, S. P & Jha, D. K. (2020). Screening of Bacteria Isolated from Refinery Sludge of Assam for Hydrocarbonoclastic Activities. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(2), 1453-1465, doi: 10.22207/JPAM.14.2.43

Grimm, A. C., & Harwood, C. S. (1997). Chemotaxis of *Pseudomonas* spp to the Polyaromatic Hydrocarbon Naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4111-4115, doi: 10.1128/AEM.63.10.4111-4115.1997

Hamzah, A., Tavakoli, A., & Rabu, A. (2011). Detection of Toluene Degradation in Bacteria Isolated from Oil Contaminated Soil. *Sains Malaysiana*, 40(11), 1231-1235, <http://journalarticle.ukm.my/2932/>

Jauhari, N., Mishra, S., Kumari, B., & Singh, S. N. (2014). Bacteria Mediated

Pengaruh Fenantren terhadap Aktivitas Enzim Katabolik *Pseudomonas Putida* TI (8)

- Aerobic Degradation of Hexacosane *in vitro* Conditions. *Bioresource Technology*, 170, 62-68, doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.091
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059-2067, doi: 10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000
- Lawal, A. T. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. A review, *Cogent Environmental Science*, 3, 1-89, doi: 10.1080/23311843.2017.1339841
- Mishra, S. & Singh, S. N. (2012). Microbial Degradation of n-Hexadecane in Mineral Salt Medium as Mediated by Degradative Enzymes. *Bioresource Technology* 111, 148-154, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.049
- Mishra, S., Singh, S. N., & Pande, V. (2014). Bacteria Induced Degradation of Fluoranthene in Minimal Salt Medium Mediated by Catabolic Enzymes *in vitro* Condition. *Bioresource Technology*, 164, 299-308, doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.076
- Nzila, A. (2013). Update on the Cometabolism of Organic Pollutants by Bacteria. *Environmental Pollution*, 178, 474-482. doi: 10.1016/j.envpol.2013.03.042
- Olivera, E. R., & Luengo, J. M. (2019). Steroids as environmental compounds recalcitrant to degradation: Genetic mechanisms of bacterial biodegradation pathways. *Genes*, 10(7), 512, doi: 10.3390/genes10070512
- Pelczar, J. M. (1986). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Seo, J-S., Keum, Y-S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278-309, doi: 10.3390/ijerph6010278
- Singh, S. N., Kumari, B., Upadhyay, S. K., Mishra, S., & Kumar, D. (2013). Bacterial Degradation of Pyrene in Minimal Salt Medium Mediated by Catechol Dioxygenases: Enzyme Purification and Molecular Size Determination. *Bioresource Technology* 133, 293-300, doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.068
- Sudarmadji, S. (1996). *Teknik Analisa Biokimiawi*. Yogyakarta: Liberty.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., & Petrov, P. (2005). Naphthalene Degradation and Biosurfactant Activity by *Bacillus Cereus* 28BN. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 60(7), 577-582, doi: 10.1515/znc-2005-7-811
- Wulandari, Y. T., Susanti, R., & Bintari, S. H. (2019). Analisis Perkembangan Titer Antibodi Hasil Vaksinasi *Infectious Bronchitis* pada Ayam Petelur *Strain Hisex Brown*. *Life Science*, 8(1), 25-33, doi: 10.15294/lifesci.v8i1.29987
- Yani, M., Charlena, C., Mas'ud Z, A., Anas, I., Setiadi, Y., Syakti, A. D. (2020). Isolation, Selection and Identification of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) Degrading Bacteria from Heavy Oil Waste (HOW)-Contaminated Soil. *HAYATI Journal of Biosciences*, 27(2), 142-153, <https://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati/article/view/31498>
- Zam, S. I. (2011). Bioremediasi Tanah yang Tercemar Limbah Pengilangan Minyak Bumi secara *In Vitro* pada Konsentrasi pH Berbeda. *Jurnal Agroteknologi*, 1(2), 1-8, <http://ejournal.uin-suska.ac.id/index.php/agroteknologi/article/view/50>



9 772614 875DD8

Kampus 3 Universitas PGRI Madiun
Jl. Auri No 14-16 Kartoharjo Madiun
Email: cheesa@unipma.ac.id
<http://e-journal.unipma.ac.id/index.php/cheesa>

