

# SAINS NATURAL

Jurnal Ilmiah Ilmu – ilmu Biologi dan Kimia  
Volume 12 No. 1 Januari 2022

## **Pelindung :**

Dr. Ir. Yunus Arifien, M.Si (Universitas Nusa Bangsa)

## **Penanggung Jawab (Advisory Editor)**

Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Universitas Nusa Bangsa)

## **Ketua Dewan Redaksi (Editor in Chief)**

Dra. Febi Nurilmala, M.Si (Bioteknologi, Universitas Nusa Bangsa)

## **Editor (Editors)**

Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc (Kimia Analitik dan lingkungan, Universitas Lampung)

Mamay Maslahat, S.Si., M.Si (Kimia Analisis, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. Tri Retno Dyah Larasati, M.Si (Kimia Lingkungan, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi-Badan Tenaga Nuklir Nasional)

## **Editor Bagian (Section Editors)**

Devy Susanty, S.Pd., M.Si (Biokimia, Universitas Nusa Bangsa)

Mia Azizah, S.Si., M.Si (Ekologi, Universitas Nusa Bangsa)

## **Editor Bahasa (Copy Editors)**

Srikandi, S.Si., M.Si (Mikrobiologi Tanah dan Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. Nia Yuliani, M.Pd (Fisiologi Tumbuhan, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. I Gusti Ayu Manik Widyastini, M.Kes (Fisiologi Hewan, Universitas Nusa Bangsa)

Nina Ariesta, S.Pd., M.Si (Kimia Fisika, Universitas Nusa Bangsa)

Ade Ayu Oksari, S.Si., M.Si (Taksonomi, Universitas Nusa Bangsa)

Gladys Ayu Paramita Kusumah Wardhani, S.Si., M.Si (Kimia Anorganik, Universitas Nusa Bangsa)

Nurlela, S.Si., M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

## **Proofreaders**

Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

## **Layout Editor**

Dian Arrisujaya, S.Pd., M.Si (Analisis Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

## **Web Admin**

Dian Arrisujaya, S.Pd., M.Si (Analisis Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

## **Sekretariat Redaksi (Secretariat)**

Nurlela, S.Si., M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

## **Penerbit :**

Fakultas MIPA Universitas Nusa Bangsa

## **Kantor :**

Kampus Universitas Nusa Bangsa

Jl. Raya K. H. Sholeh Iskandar Km. 4, Cimanggu, Tanah Sareal Bogor 16166

Telp. (0251) 8340217, 7535605 Fax. (0251) 7535605

Website : <http://ejournalunb.ac.id/index.php/JSN/index>

e-mail : [jsainsnatural.unb@gmail.com](mailto:jsainsnatural.unb@gmail.com)

Jurnal Sains Natural merupakan jurnal ilmiah yang memuat artikel hasil penelitian dan kupasan (*review*) dalam bidang Biologi dan Kimia yang orsinil dan belum serta tidak dipublikasikan dalam media lain. Naskah dikirim ke kantor editor. Naskah yang masuk akan melalui proses seleksi mitra bestari dan editor. Naskah yang dapat dimuat dengan perbaikan akan dikirimkan kembali ke penulis untuk disempurnakan, sedangkan naskah yang tidak dapat dimuat hanya akan dikembalikan jika disertai amplop balasan yang berperangko secukupnya. Informasi lengkap untuk pemuatan artikel dan petunjuk penulisan tersedia disetiap terbitan. Calon penulis artikel yang memerlukan petunjuk penulisan artikel, dapat menghubungi Redaksi Pelaksana Jurnal Sains Natural. Jurnal ini terbit secara berkala sebanyak dua kali dalam setahun (Januari dan Juli).

Journal of Natural Science is a scientific journal containing research articles and analysis (*review*) in the field of Biology and Chemistry of original and yet also not published in other media. The manuscript is sent to the office of the editor. Manuscript received will be through the selected partner process and editor. Scripts that can be loaded with the repair will be sent back to the author to be refined, while the script which can not be loaded will be returned only if accompanied by a stamped reply envelope. Complete information and instructions for loading article writing is available in every issue. Prospective authors of articles that need help writing the article, please contact the Managing Editor of Journal of Natural Science. The journal is published on a regular basis twice a year (January and July)

Mengutip ringkasan dan pernyataan atau mencetak ulang gambar atau tabel dari jurnal ini harus mendapat ijin dari penulis. Produksi ulang dalam bentuk kumpulan cetakan ulang untuk keperluan apapun harus seijin salah satu penulis dan mendapat lisensi dari penerbit. Jurnal ini diedarkan sebagai tukaran dan untuk perguruan tinggi, lembaga penelitian dan perpustakaan di dalam dan luar negeri.

Citing a summary and a statement or reprint pictures or tables from this journal should get permission from the author. Reproduced in the form of a collection of reprint for any purpose permission must be from one of the authors and get a license from the publisher. The journal is distributed as an exchange and for universities, research institutions and libraries at home and abroad.

## KATA PENGANTAR

Penerbitan Jurnal Sains Natural Volume 12 No.1, Bulan Januari 2022 dapat terlaksana berkat kerja sama semua pihak. Kami berharap isi dalam Jurnal Sains Natural ini dapat menarik minat pembaca dan diambil manfaat serta kegunaan dari hasil – hasil penelitian di dalamnya.

Pada terbitan ini membahas aspek – aspek Biologi dan Kimia seperti: *Optimalisasi Pelarutan Tembaga dari Limbah Elektronik, Tablet Klorin Dalam Menurunkan Kandungan Coliform, Kadar Nitrit dan Nitrat Pembuangan Limbah Cair Industri Ikan Asap, Aplikasi ICP-MS Dalam Analisis Zink, Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Daun Cengkeh (Syzigium aromaticum L), dan Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia ) Asal Kabupaten Bogor Sebagai Penangkal Radikal Bebas.*

Kami mengharapkan masukan – masukan berupa kritik maupun saran yang membangun yang ditujukan baik pada pengelola maupun para penulis jurnal ini. Kepada semua pihak yang telah terlibat dalam penerbitan ini, pengelola mohon maaf jika ada kesalahan – kesalahan yang tidak kami sengaja. Kami ucapkan terima kasih terutama pada mitra bestari atas segala bantuannya sehingga terbitnya Jurnal Ilmiah Sains Natural yang kami anggap kualitasnya sudah lebih baik.

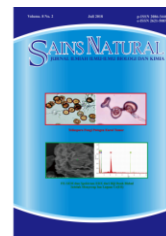
Bogor, Januari 2022

Ketua Dewan Redaksi

# Sains Natural

Jurnal Ilmiah Ilmu – ilmu Biologi dan Kimia

Volume 12	Januari 2022	No. 1
<i>Research Articles</i>		
1. <i>Optimization of Copper Dissolution from Electronic Waste Printed Circuit Board Using Leaching Method</i> <b>Faradisa Athalla, Erni Sulistiawati, and Iwan Setiawan.....</b>		01-09
2. <i>The Effectiveness of Chlorine Tablets to Reducing Coliform in Wastewater Treatment Plant</i> <b>Sri Arofah Mulyati, Mia Azizah, Srikandi Srikandi, Maidaswar Maidaswar, Neneng Atikah.....</b>		10-16
3. <i>Determination of Nitrite and Nitrate Level in Wastewater Discharge from Smoked Fish Industry</i> <b>Wina Yulianti, Ima Kusumanti, and Nurul Jannah.....</b>		17-22
4. <i>Application of The Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) Method in Zinc Analysis</i> <b>Nabilah Bilqis, Erni Sulistiawati, and Miftakh Nur Rahman .....</b>		23-26
5. <i>Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria of Clove Leaf (Syzygium aromaticum L) and Mechanism of Action Antibacterial</i> <b>Sogandi Sogandi, Irviyani Irviyani, Usep Suhendar.....</b>		27-35
6. <i>Utilization of Binahong (Anredera cordifolia) Leaves Extract from Bogor Regency as Free Radical Scavenging Activity</i> <b>Novi Fajar Utami, Usep Suhendar, Anisa Hidayatul Amini.....</b>		36-44



## OPTIMIZATION OF COPPER DISSOLUTION FROM ELECTRONIC WASTE PRINTED CIRCUIT BOARD USING LEACHING METHOD

Faradisa Athalla<sup>1)\*</sup>, Erni Sulistiawati<sup>2)</sup> Iwan Setiawan<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Analisis Kimia, Sekolah Vokasi, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kumbang No.14, Babakan, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, 16128, Indonesia;

<sup>2)</sup> Sekolah Vokasi, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kumbang No.14 Babakan,, Bogor, 16128, Indonesia;

<sup>3)</sup>Pusat Penelitian Metalurgi dan Material, Kawasan PUSPIPTEK Gedung 470, Muncul, Setu, Muncul, Kec. Setu, Kota Tangerang Selatan, 15314, Indonesia.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 Dec 2020,

Revised xx xxx 2021,

Accepted xx xxx 2021

Available online xx xxx 2021

#### Keywords:

- ✓ *electronic*
- ✓ *waste*
- ✓ *PCB*
- ✓ *dissolution*
- ✓ *copper*

#### \*corresponding author:

[faradisaathalla123@gmail.com](mailto:faradisaathalla123@gmail.com)

Phone: +62895610427531

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.322>

### ABSTRACT

*Electronic waste contains hazardous materials which have an adverse impact on the environment. Therefore, a solution is needed to recycle electronic waste. One solution is recovering copper metal from the Printed Circuit Board (PCB) in electronic waste. The dissolution of copper is carried out by the leaching method, which means dissolving copper using a selective solvent. Analysis of copper was performed using Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). This experiment aims to determine the factors that influence the optimization of copper dissolution from PCB electronic waste by leaching method and analysis the copper content using ICP-OES. The primary data obtained is the per cent recovery of each factor that affects copper dissolution, which is the concentration of sulfuric acid as a solvent, the percentage of solid / liquid, the speed of stirring, the temperature, and the length of stirring. The optimum conditions were achieved in the form of the highest recovery in each variation, which is 9.8% sulfuric acid, 5% solid/liquid percentage, 200 rpm stirring speed, and at temperature 60 °C with a stirring time of 120 minutes, the per cent recovery was obtained respectively 79.83%; 74.86%; 76.52%; and 54.84%.*

### ABSTRAK

#### Optimalisasi Pelarutan Tembaga dari Limbah Elektronik Printed Circuit Board dengan Metode Leaching

Limbah elektronik mengandung bahan-bahan berbahaya yang berdampak buruk bagi lingkungan. Oleh sebab itu, diperlukan solusi untuk mendaur ulang limbah elektronik salah satunya adalah pengambilan kembali atau recovery logam tembaga dari *Printed Circuit Board* (PCB) pada limbah elektronik. Pelarutan tembaga dilakukan dengan metode *leaching*, yaitu dengan melarutkan tembaga menggunakan pelarut yang selektif. Analisis terhadap kadar tembaga dilakukan menggunakan *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy* (ICP-OES). Percobaan ini bertujuan untuk mendapatkan faktor-faktor yang berpengaruh pada optimalisasi pelarutan tembaga dari limbah elektronik PCB dengan metode *leaching* dengan analisis terhadap kadar tembaga menggunakan ICP-OES. Data primer yang diperoleh adalah persen *recovery* dari setiap faktor-faktor yang memengaruhi pelarutan tembaga, yaitu konsentrasi asam sulfat sebagai pelarut, persentase *solid/liquid*, kecepatan pengadukan, suhu, dan lama pengadukan. Kondisi optimum yang dicapai berupa *recovery* tertinggi pada setiap variasi, yaitu pada 9,8% asam sulfat, persentase 5% *solid/liquid*, kecepatan pengadukan 200 rpm, dan suhu pada 60 °C dengan lama pengadukan 120 menit diperoleh persen *recovery* secara berturut-turut 79,83%; 74,86%; 76,52%; dan 54,84%.

Kata kunci : elektronik, limbah, PCB, pelarut, tembaga



## PENDAHULUAN

Produk elektronik di era modern ini terus berinovasi dan semakin canggih. Hal ini menyebabkan penjualannya di pasaran terus mengalami peningkatan setiap tahun. Namun, nyatanya inovasi produk elektronik yang dikembangkan saat ini bukanlah teknologi tahan lama, sehingga mendorong konsumen untuk mengganti barang elektroniknya dalam kurun waktu yang lebih cepat. Kekhawatiran pun timbul akan limbah elektronik yang disebabkan oleh industri ini (Sadah *et al.*, 2015). Limbah elektronik merupakan barang-barang elektronik atau listrik yang tidak digunakan lagi dan siap digantikan dengan barang-barang baru yang lebih canggih dan berkualitas (Nahor, 2019). Data yang dirilis *United Nations University Institute for the Advances Study of Sustainability* (UNU-IAS) menyebut limbah elektronik dunia telah mencapai 41,8 juta ton pada tahun 2014 (Kaya, 2019). Sedangkan di Indonesia sendiri, tercatat sejak tahun 2009 hingga 2016 jumlah limbah elektronik terus meningkat mencapai 900.000 ton (Arthaya *et al.*, 2018).

Melimpahnya jumlah limbah elektronik saat ini nyatanya masih kurang mendapat perhatian serius dari pemerintah Indonesia, karena hingga kini belum ada sistem pengumpulan dan pengangkutan limbah elektronik yang terarah (Wahyono, 2013). Limbah elektronik tidak dapat disamakan dengan limbah pada umumnya karena limbah elektronik mengandung 40% logam diantaranya logam-logam berat (Riafinola *et al.*, 2018). Apabila limbah elektronik dibuang ke tempat pembuangan sampah, limbah akan tercuci ketika hujan. Air hujan pada timbunan sampah (lindi) mengandung logam berat dan zat beracun lainnya dapat mencemari sumber daya tanah dan air. Selain itu, racun tersebut dapat pula merusak jaringan tubuh manusia bahkan menyebabkan berbagai penyakit berbahaya (Nahor, 2019). Oleh karena itu, diperlukan upaya pengolahan limbah elektronik, salah satunya adalah pengambilan kembali atau *recovery* logam tembaga dari komponen yang terdapat dalam limbah elektronik, yaitu *Printed Circuit Board* (PCB). PCB merupakan papan yang terbuat dari bahan komposit polimer yang digunakan untuk menempatkan alat-alat elektronik yang dirangkai menjadi suatu rangkaian elektronik yang terintegrasi. Kandungan terbesar dari suatu PCB adalah logam tembaga yaitu 30,57% (Birloaga *et al.*, 2013).

Tembaga memiliki beragam kegunaan baik dalam bentuk murni maupun paduan, yaitu sebagai bahan peralatan transportasi, bahan pembuatan koin, bahan pipa air, dan lain-lain (Sari, 2018). Oleh karena itu, daur ulang tembaga dapat menjadi solusi dari pemanfaatan limbah elektronik yang sudah tidak digunakan lagi. Salah satu metode yang efisien untuk *recovery* tembaga dari limbah elektronik adalah *leaching*. *Leaching* dilakukan dengan melarutkan tembaga dari limbah PCB ke suatu pelarut (*leaching agent*) (Yuliusman, 2016). Beberapa faktor yang memengaruhi pelarutan tembaga dari limbah PCB dengan metode *leaching*, yaitu konsentrasi asam sulfat sebagai pelarut, persentase *solid/liquid*, kecepatan pengadukan, suhu, dan lama pengadukan. Berdasarkan hal-hal tersebut percobaan ini melakukan variasi pada setiap faktor yang memengaruhi pelarutan tembaga untuk menentukan kondisi optimum dalam *recovery* tembaga dari limbah PCB. Analisis kadar tembaga dalam percobaan dilakukan menggunakan *Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectroscopy* (ICP–OES) dikarenakan mampu menganalisis secara selektif.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan, yaitu limbah PCB, asam sulfat, *aquademineral*, larutan standar multielemen 1000 ppm, asam nitrat 1:1, dan kertas saring Whatman 42. Alat-alat yang digunakan, yaitu reaktor yang terbuat dari bahan gelas dengan kapasitas 1 L, pemanas listrik, pengaduk listrik Flotation Tester-1000 Heiko Seisakusho, pengendali suhu, neraca analitik, gelas piala, kaca arloji, batang pengaduk, sudip, bulb, pipet volumetrik, pipet tetes, corong, labu takar, gelas ukur, botol semprot, *Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectroscopy* (ICP–OES) Agilent 700, *X-Ray Fluorescence* (XRF) S2 Puma Bruker, *stopwatch*, dan oven.

### Metode

#### Penentuan Kadar Air Limbah PCB

Limbah PCB yang telah diperkecil ukurannya menggunakan palu ditentukan kadar airnya dengan cara cawan porselin ditimbang. Selanjutnya, cawan porselin dipanaskan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam, didinginkan, kemudian ditimbang. Langkah ini

diulangi hingga bobot cawan porselin yang diperoleh konstan. Sampel limbah PCB ditimbang ke dalam cawan tersebut kemudian dipanaskan ke dalam oven suhu 105 °C selama 1 jam, didinginkan, kemudian ditimbang. Langkah ini diulangi hingga diperoleh bobot yang konstan. Kadar air (%) dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Bobot sampel (g)

B = Bobot sampel kering (g)

### **Pembuatan Larutan Standar Tembaga**

Pembuatan larutan standar tembaga dilakukan dengan cara sejumlah larutan standar multielemen 1000 ppm dipipet kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL yang telah berisi 3 tetes asam nitrat pekat 1:1 dan ditera menggunakan *aquademineral* untuk membuat deret standar tembaga 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Deret standar tersebut kemudian dianalisis kadar tembaga menggunakan ICP-OES.

### **Pelarutan Tembaga Limbah PCB menggunakan Variasi Konsentrasi Asam Sulfat**

Limbah PCB ditimbang dalam reaktor gelas kemudian ditambahkan larutan asam sulfat konsentrasi 4,9% dalam *aquademineral* sebanyak 500 mL. *Leaching* dilakukan dengan cara memasukkan pengaduk listrik ke dalam reaktor dengan kecepatan pengadukan 100 putaran per menit (rpm) selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah selesai, larutan disaring menggunakan saringan Whatman 42. Filtrat yang diperoleh dilakukan pengenceran dan ditera *aquademineral* setelah itu dianalisis kadar tembaga menggunakan ICP-OES. Hal yang sama dilakukan pada konsentrasi asam sulfat 0%; 9,8%; dan 14,7%.

### **Pelarutan Tembaga Limbah PCB menggunakan Variasi Persentase *Solid/Liquid***

Limbah PCB ditimbang bervariasi dengan persentase *solid/liquid* 5%; 10%; dan 20% kemudian ditambahkan larutan asam sulfat 14,7% dalam *aquademineral* sebanyak 500 mL. *Leaching* dilakukan dengan cara memasukkan pengaduk listrik ke dalam reaktor dengan kecepatan pengadukan 100 rpm selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah selesai, larutan disaring

menggunakan saringan Whatman 42. Filtrat yang diperoleh dilakukan pengenceran dan ditera *aquademineral* setelah itu dianalisis kadar tembaga menggunakan ICP-OES.

### **Pelarutan Tembaga Limbah PCB menggunakan Variasi Kecepatan Pengadukan**

Limbah PCB ditimbang 20% *solid/liquid* kemudian ditambahkan larutan asam sulfat 14,7% dalam Aqua *aquademineral* sebanyak 500 mL. *Leaching* dilakukan dengan cara memasukkan pengaduk listrik ke dalam reaktor dengan kecepatan pengadukan 100 rpm selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah selesai, larutan disaring menggunakan saringan Whatman 42. Filtrat yang diperoleh dilakukan pengenceran dan ditera *aquademineral* setelah itu dianalisis kadar tembaga menggunakan ICP-OES. Hal yang sama dilakukan pada kecepatan pengadukan 50; 200; dan 300 rpm.

### **Pelarutan Tembaga Limbah PCB menggunakan Variasi Suhu dan Lama Pengadukan**

Larutan asam sulfat 14,7% dalam *aquademineral* sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam reaktor dan suhu dinaikkan sampai 45 °C. Setelah suhu tercapai, ditambahkan limbah PCB 20% *solid/liquid*. *Leaching* dilakukan dengan cara memasukkan pengaduk listrik ke dalam reaktor dengan kecepatan pengadukan 300 rpm, pada rentang lama pengadukan 0; 15; 30; 60; dan 120 menit dilakukan *sampling* larutan sebanyak 5 mL. Larutan tersebut disaring menggunakan saringan Whatman 42. Filtrat yang diperoleh dilakukan pengenceran dan ditera *aquademineral*. Setelah itu, dianalisis kadar tembaga menggunakan ICP-OES. Hal yang sama dilakukan pada suhu 60 °C dan 70 °C.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Limbah *Printed Circuit Board* (PCB) yang digunakan sebagai bahan baku dalam percobaan ini diambil dari pabrik penghasil limbah elektronik di Cikarang. PCB mengandung sekitar 30% material logam, 40% resin berbasah dasar organik, dan 30% material kaca sebagai penguat resin organik (Hino *et al.*, 2009). Bahan resin organik dan material kaca merupakan polimer yang digunakan sebagai tempat melekatnya logam. Limbah PCB tersebut pada awalnya

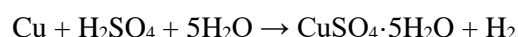
dilakukan uji menggunakan *X-Ray Fluorescence* (XRF) untuk mengetahui komponen logam yang terkandung didalamnya yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Sampel limbah PCB yang digunakan pada percobaan ini tidak dipanaskan suhu tinggi, karena pemanasan di atas titik leleh solder dapat melepaskan gas beracun, tinggi konsumsi energi, dan merusak beberapa komponen yang dapat digunakan kembali (Zhang *et al.*, 2015). Preparasi sampel limbah PCB dilakukan dengan cara memperkecil ukuran sampel menggunakan palu untuk memperbesar luas permukaan agar lebih mudah berinteraksi dengan pelarut.

*Aqua regia*, sianida, dan asam sulfat merupakan pelarut yang umum digunakan untuk melarutkan logam. *Aqua regia* dan sianida memberikan hasil yang baik dalam melarutkan logam, namun zat-zat ini bersifat racun dan menimbulkan pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, percobaan ini menggunakan asam sulfat sebagai pelarut karena ion sulfat memiliki afinitas tinggi untuk ion logam serta lebih ekonomis dari *aqua regia* dan sianida (Hossain *et al.*, 2018). Selain itu, asam sulfat juga memiliki tingkat *leaching* (ekstraksi) tembaga yang tinggi, tingkat polusi lingkungan yang rendah, dan konsumsi energi yang rendah (Wang *et al.*, 2019).

Pelarutan tembaga dari limbah PCB dengan asam sulfat menghasilkan warna biru

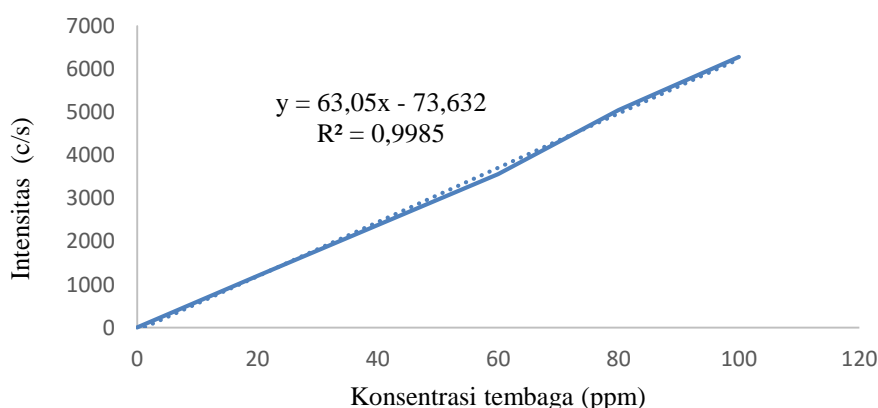
pada larutannya. Warna biru tersebut diketahui sebagai larutan tembaga (II) sulfat (Vogel, 1979) dengan reaksi menurut Fitrony *et al.*, (2013) sebagai berikut:



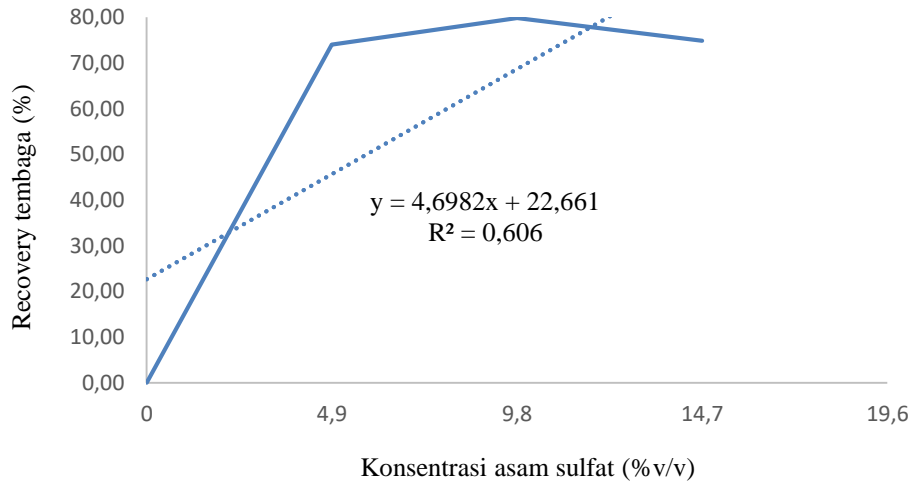
Setelah proses pelarutan selesai, masih terdapat residu yang tidak larut sehingga dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman 42. Filtrat tersebut kemudian dilakukan pengenceran agar dapat masuk pada rentang deret standar. Analisis dilakukan menggunakan ICP-OES dengan kurva deret standar tembaga terlihat pada Gambar 1. Berdasarkan Gambar 1, diketahui bahwa kurva deret standar tembaga memiliki persamaan garis  $Y = -73,6324 + 63,0495X$  dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9985. Hal ini menunjukkan linearitas yang baik dikarenakan telah memenuhi persyaratan AOAC (2011) yaitu  $R^2 > 0,990$  sebagai keberterimaan dalam metode analisis. Linearitas menggambarkan kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Pirdaus *et al.*, 2018). Penggunaan variasi pada percobaan dilakukan untuk melihat pengaruhnya terhadap pelarutan tembaga dari limbah PCB.

Tabel 1 Hasil XRF limbah PCB kering

Unsur	Persen Fraksi (%)
CuO	22,74
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	24,88
NiO	0,02
Lainnya (Cl, Na <sub>2</sub> O, MgO, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub> , P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , SO <sub>3</sub> , CaO, ZnO, BaO, MnO <sub>2</sub> , SrO)	52,36



Gambar 1. Kurva deret standar tembaga



Gambar 2. Kurva antara *recovery* tembaga dengan konsentrasi asam sulfat

### Pengaruh Konsentrasi Asam Sulfat terhadap Pelarutan Tembaga

Konsentrasi asam sulfat sebagai pelarut memainkan peran yang sangat penting yaitu aktivitas  $H^+$  yang menghasilkan pelepasan ikatan-ikatan dalam limbah PCB untuk dapat melarutkan tembaga secara optimum. Percobaan ini memvariasikan beberapa konsentrasi asam sulfat, yaitu 0%; 4,9%; 9,8%; dan 14,7% untuk melihat pengaruh dari besarnya konsentrasi asam sulfat terhadap kemampuannya dalam melarutkan tembaga dari limbah PCB dengan persentase *solid/liquid* 5%, kecepatan pengadukan 100 rpm, dan dilakukan pada suhu ruang. Hasil yang diperoleh terlihat pada Gambar 2.

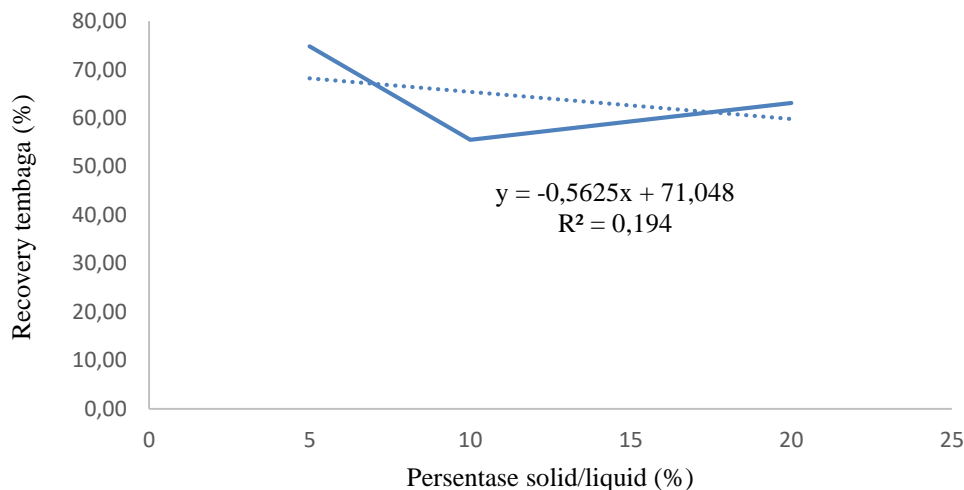
Pemilihan variasi konsentrasi tersebut berdasarkan percobaan yang dilakukan Royani *et al.* (2017), pada percobaan tersebut hasil yang diperoleh menunjukkan meningkatnya *recovery* logam dengan meningkatnya konsentrasi asam sulfat. Hal itu dikarenakan peningkatan konsentrasi asam sulfat dapat meningkatkan laju kecepatan reaksi dan laju difusi  $H^+$ . Konsentrasi yang lebih tinggi dapat meningkatkan laju dari *leaching*, dikarenakan semakin tingginya konsentrasi pelarut akan meningkatkan luas permukaan kontak antara molekul solut dengan pelarut (Habashi, 1970). Berdasarkan Gambar 2, dapat diketahui bahwa ketika konsentrasi asam sulfat lebih dari 4,9%, laju *leaching* tembaga tidak berubah secara signifikan. Hal ini karena peningkatan konsentrasi asam sulfat dapat mendorong pelepasan ikatan-ikatan fase mineral dalam sampel dan membuat tembaga terekstrak dalam jumlah besar. Konsentrasi asam sulfat 9,8% memiliki *recovery* tembaga tertinggi, namun terjadi penurunan *recovery* pada 14,7% kemungkinan karena kemampuan larutan asam

sulfat untuk melarutkan tembaga telah jenuh sehingga penambahan konsentrasi lebih tinggi tidak lagi efektif (Ifa & Nurjannah, 2017). Di samping itu, percobaan ini menggunakan sampel basah yang menyebabkan nisbah massa dari sampel dapat berubah dan memengaruhi jumlah tembaga yang akan larut.

### Pengaruh *Solid Liquid* Limbah PCB terhadap Pelarutan Tembaga

Percobaan pelarutan tembaga menggunakan variasi *solid/liquid* dilakukan dengan pelarut asam sulfat konsentrasi 14,7%. Variasi persentase *solid/liquid* yang dilakukan pada percobaan hanya pada 5%; 10%; dan 20% dimana hal tersebut belum memenuhi asas statistik, hal ini dikarenakan keterbatasan waktu percobaan dalam penyusunan karya ilmiah ini. Ketiga variasi persentase *solid/liquid* dilakukan dengan kecepatan pengadukan 100 rpm pada suhu ruang. Hasil yang diperoleh terlihat pada Gambar 3.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa persentase *solid/liquid* 5% memiliki *recovery* tembaga tertinggi. Semakin tingginya persentase *solid/liquid* akan menurunkan jumlah tembaga yang akan larut. Hal ini disebabkan pada saat persentase *solid/liquid* bertambah maka jumlah limbah PCB pun bertambah dengan jumlah pelarut untuk *leaching* tetap sama yaitu 500 mL. Kesempatan untuk bereaksi antara tembaga dengan larutan asam sulfat pun akan semakin kecil akibat mobilitas (gerakan) atom atau ion yang terbatas (Sarempa & Isjudarto, 2019). Hal ini sesuai dengan pernyataan Habashi (1970), laju dari *leaching* akan semakin menurun bila persentase *solid/liquid* dinaikkan.



Gambar 3. Kurva antara *recovery* tembaga dengan persentase *solid/liquid*

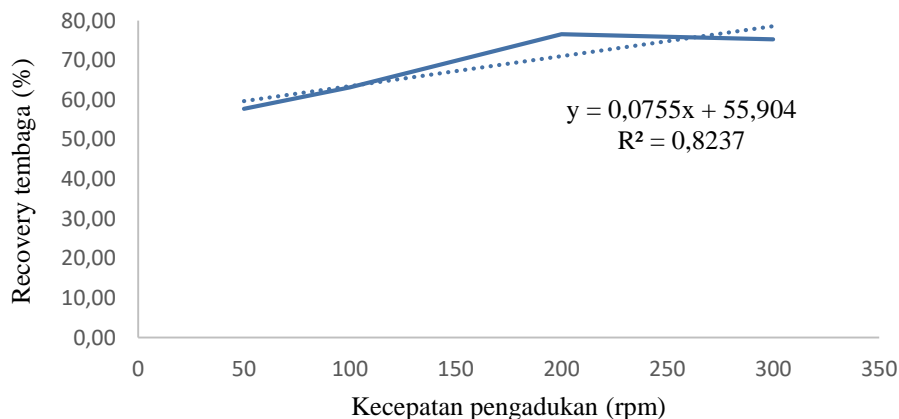
Berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa persentase 20% *solid/liquid* mengalami peningkatan *recovery* tembaga, dimana seharusnya *recovery* semakin menurun. Hal ini terjadi akibat percobaan dilakukan pada suhu ruang yang memungkinkan pada 20% *solid/liquid* terjadi pada suhu yang lebih tinggi dari 10% *solid/liquid* sehingga tembaga dapat larut lebih baik karena suhu yang lebih tinggi akan meningkatkan laju *leaching*. Percobaan selanjutnya menggunakan persentase *solid/liquid* 20% dikarenakan percobaan ini diperuntukkan untuk kapasitas industri yang akan menampung banyak limbah PCB dengan penggunaan asam sulfat yang ditekan jumlahnya agar tidak terlalu membutuhkan biaya besar.

Penggunaan pelarut asam sulfat 14,7% dipilih karena dalam percobaan ini mengacu pada hasil teoritis bahwa semakin tingginya konsentrasi asam sulfat akan meningkatkan *recovery* logam (Royani *et al.* 2017). Namun,

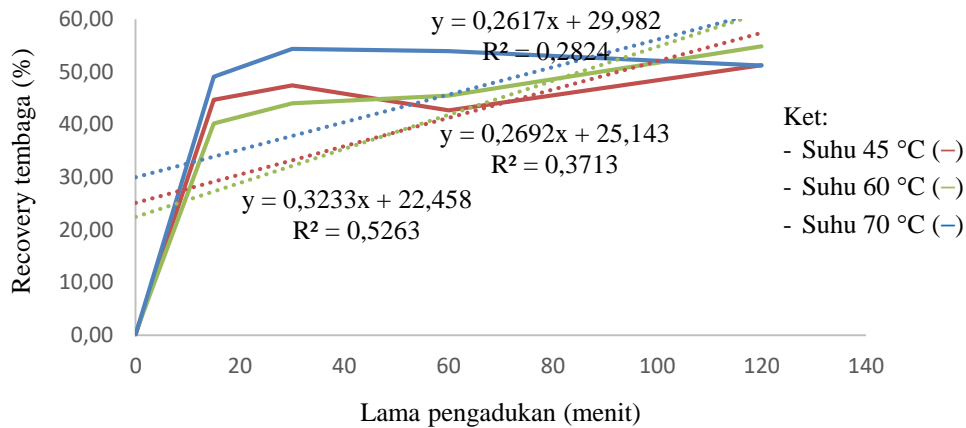
hasil pada percobaan menunjukkan penurunan *recovery* tembaga pada variasi konsentrasi asam sulfat tertinggi tersebut. Keterbatasan waktu dalam percobaan membuat percobaan tidak dapat diulang kembali, kemungkinan hasil percobaan variasi *solid/liquid* akan lebih baik bila menggunakan konsentrasi asam sulfat optimum pada percobaan ini, yaitu 9,8%.

#### Pengaruh Kecepatan Pengadukan terhadap Pelarutan Tembaga

Pelarutan tembaga dari limbah PCB selanjutnya dilakukan percobaan variasi kecepatan pengadukan pada proses *leaching* dalam reaktor dengan konsentrasi pelarut ditetapkan 14,7% asam sulfat, persentase *solid/liquid* 20%, dan dilakukan pada suhu ruang. Variasi kecepatan pengadukan dilakukan pada 50; 100; 200; dan 300 rpm. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva antara *recovery* tembaga dengan kecepatan pengadukan



Gambar 5. Kurva antara *recovery* tembaga dengan lama pengadukan menggunakan variasi suhu

Variasi kecepatan pengadukan yang dipilih pada percobaan ini mengacu pada percobaan Royani *et al.* (2017), yaitu peningkatan *recovery* logam akan meningkat dengan meningkatnya kecepatan pengadukan. Pengadukan memberikan gaya mekanik yang baik untuk kontak antara padatan dan pelarut sehingga laju difusi meningkat (Prasetyo & Yosephine, 2012). Selain itu, pengadukan dapat memengaruhi pelepasan elemen dengan meningkatkan difusi internal ke permukaan partikel yang tidak bereaksi. Peningkatan kecepatan pengadukan memungkinkan sampel terurai dengan baik sehingga tingkat *leaching* meningkat (Ni'am *et al.*, 2019). Berdasarkan Gambar 4, peningkatan kecepatan pengadukan dari 50 rpm hingga 200 rpm sejalan dengan meningkatnya *recovery* tembaga. Kecepatan pengadukan 200 rpm memiliki *recovery* tembaga tertinggi. Namun ketika melebihi 200 rpm, difusi eksternal (difusi menuju lapisan batas) menjadi kecil dan difusi menjadi dikontrol difusi intenal (difusi menuju permukaan padatan) oleh karena itu tingkat *leaching* pada dasarnya tidak berubah (Shi *et al.*, 2019).

#### Pengaruh Suhu dan Lama Pengadukan terhadap Pelarutan Tembaga

Pelarutan tembaga dari limbah PCB juga dipengaruhi oleh suhu dan lama pengadukan. Percobaan ini memvariasikan beberapa suhu untuk melihat pengaruh dari tinggi rendahnya suhu dengan lama pengadukan 0; 15; 30; 60; dan 120 menit pada proses *leaching* terhadap kemampuannya dalam melarutkan tembaga dari limbah PCB dengan ditetapkan konsentrasi asam sulfat yang digunakan 14,7%, persentase *solid/liquid* 20%, dan kecepatan pengadukan 300

rpm. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, diketahui *recovery* logam tembaga dari limbah PCB hanya memiliki nilai tertinggi sebesar 79,83%. Hal ini kemungkinan karena keberadaan polimer yang melapisi tembaga dalam PCB. Menurut Bhavsar (2014), di dalam PCB selain terkandung tembaga terdapat material laminate. Laminate atau substrat digunakan untuk menahan lapisan-lapisan pada PCB yang terdiri dari komposit resin dan bahan penguat. Terdapat berbagai macam jenis substrat sesuai keperuntukannya dan jenis yang paling umum digunakan adalah FR-4. Jenis FR-4 memiliki sifat ketahanan beban yang baik, tahan terhadap api, dan ketika ada kenaikan suhu sifat mekanik, listrik, fisik material tetap terjaga. Standar dari FR-4 memiliki suhu dekomposisi tinggi yaitu lebih dari 345 °C (Sunstone, 2020).

Resin berperan sebagai zat pengikat di dalam PCB. Jenis substrat FR-4 memiliki jenis resin, yaitu epoksi yang memiliki sifat ketahanan retak yang tinggi dan stabil pada suhu tinggi (Ellis & Smith, 2009). *Fiberglass* merupakan bahan penguat dalam papan PCB yang berfungsi untuk memperkuat matriks polimer (resin) untuk membentuk komposit. Sebagai penguat, *fiberglass* berkontribusi terutama listrik, termal, dan manfaat mekanis ke matriks polimer di sekitarnya. *Fiberglass* merupakan isolator yang sangat baik untuk PCB karena memiliki sifat dielektrik yang baik, memiliki stabilitas termal yang sangat baik, serta sensitivitas rendah terhadap kelembaban dan korosi kimia (Longobardo, 2009). Keberadaan dari polimer yang melapisi tembaga dalam PCB inilah yang kemungkinan menghambat proses difusi antara ion tembaga dengan pelarut asam sulfat

dikarenakan dalam preparasi limbah PCB ini tidak dilakukan pemanasan suhu tinggi untuk mendekomposisi bahan-bahan tersebut sehingga pelarutan tembaga belum dapat maksimal.

## KESIMPULAN

Kondisi optimum yang dicapai berupa *recovery* tertinggi pada setiap variasi pelarutan tembaga dari limbah elektronik *Printed Circuit Board* (PCB) dengan metode *leaching* dengan analisis terhadap kadar tembaga menggunakan *Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectroscopy* (ICP–OES) diperoleh pada konsentrasi 9,8% asam sulfat yaitu sebesar 79,83%, pada persentase *solid/liquid* 5% yaitu 74,86%, kecepatan pengadukan 200 rpm yaitu sebesar 76,52%, serta suhu 60 °C dengan lama pengadukan 120 menit yaitu 54,84%.

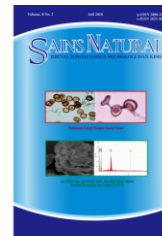
## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sampaikan terimakasih kepada Dr. drh. Erni Sulistiawati, SP1, APVet. selaku dosen pembimbing, Dr. Ir. Rudi Subagja, Januar Irawan, S.T., Bimo Sukma Wibawa, A.Md., dan Suyanto yang telah membantu selama pengumpulan data. Terima kasih pun penulis ucapkan pada Almarhumah Ibu, Ayah, serta seluruh pihak yang telah mendukung penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arthaya, B.M., Ariningsih, P.K., & Haryani C. (2018). Peran konsep reverse logistic dalam perancangan penanganan baterai laptop bekas. *J. Oto. Ktrl. Inst*, 10(2), 97-110.
- Bhavsar, Shinde, N.R. & Bhat M. (2014). Determination of mechanical properties of PCB. *IJMER*, 2(4), 2321-5747.
- Birloaga, I., Michelis, I.D., Ferella, F., Buzatu, M. & Veglio, F. (2013). Study on the influence of various factors in the hydrometallurgical processing of waste printed circuit boards for copper and gold recovery. *Waste Manage*, 33, 935-941.
- Ellis, B. & Smith, R. (2009). *Polymer a Property Database*. Boca Raton, US: Taylor & Francis Group.
- Fitrony, Fauzi, R., Qadariyah, L. & Mahfud. (2013). Pembuatan kristal tembaga sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dari tembaga bekas kumparan. *Jurnal Teknik POMITS*. 2(1), 121-125.
- Habashi, F. (1970). *Principles of Extractive Metallurgy Volume 2 Hydrometallurgy*. London, UK: Gordon & Breach.
- Hino, T., Agawa, R., Moriya, Y., Nishida, M., Tsugita, Y. & Araki, T. (2009). Techniques to kumseparate metal from waste printed circuit boards from discarded personal computers. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 11, 42-54.
- Hossain, M.S., Yahaya, A.N.A. & Yacob, L.S. (2018). Selective recovery of copper from waste mobile phone printed circuit boards using sulphuric acid leaching. *Prosiding The 3rd International Conference on Green Chemical Engineering Technology*; 2018. Materials Science. 21698–21702.
- Ifa, L., Nurjannah, N. (2017). Ekstraksi vanadium pentaoksida ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ) dari katalis bekas. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi IV*; 2017 Nov 9; Samarinda. Samarinda: Fakultas Teknik – Universitas Mulawarman.
- Kaya, M. (2019). *Electronic Waste and Printed Circuit Board Recycling Technologies*. Eskitehir, TR: Springer.
- Longobardo, A.V. (2009). Glass fibers for printed circuit boards. *Fiberglass and Glass Technology*. 175-196.
- Nahor, J.J. (2019). Implikasi dan pengelolaan limbah elektronik. *Buletin Utama Teknik*. 14(2), 116-119.
- Ni'am, A.C., Wang, Y.F., Chen, S.W. & You, S.J. (2019). Recovery of rare earth elements from waste permanent magnet (WPMs) via selective leaching using the taguchi method. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 97, 137-145.
- Parubak, A.S., Sugiharto, E. & Mudjiran, H. (2001). Pengaruh salinitas terhadap pelarutan tembaga (Cu), timbal (Pb), dan

- seng (Zn) dalam sampel tailing (pasir sisa). *Indonesian Journal of Chemistry*. 1(1), 16-22.
- Pirdaus, P., Rahman, M., Rinawati, Juliasih, N.L., Pratama, D., & Kiswandono, A.A. (2018). Verifikasi metode analisis logam Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Co, Fe, Mn dan Ba pada air menggunakan *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer* (ICP-OES). *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*. 3(1), 1-10.
- Prasetyo, S. & Yosephine, F. (2012). Model perpindahan massa pada ekstraksi saponin biji teh dengan pelarut isopropil alcohol 50% dengan pengontakan secara disperse menggunakan analisis dimensi. *Reaktor*. 14(2), 87-94.
- Riafinola, H., Lifitri, S., Ginting, M.T & Budiana, B. (2018). Kajian efektivitas larutan etsa  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{FeCl}_3$ , dan  $\text{CuCl}_2$  pada *multilayer rigid printed circuit board*. *Journal of Applied Electrical Engineering*. 3(1), 15-18.
- Royani, A., Subagja, R., Manaf, A. (2017). Studi pelindian mangan secara reduksi dengan menggunakan larutan asam sulfat. *Jurnal Riset Teknologi Industri*. 11(1), 1-9.
- Sadah, K., Syifaul, Fuada, S., & Hidayati, N. (2015). Model baru dalam penanganan limbah elektronik di Indonesia berbasis integrasi seni. *Prosiding SENTIA*; 2015; Malang. Malang: Politeknik Negeri Malang. (7), 1-7.
- Sarempa, A. & Isjudarto, A. (2019). Optimasi recovery emas dan perak dengan sianidasi pada deposit bijih emas kadar rendah di PT. Nusa Halmahera Minerals Daerah Gosowong Kabupaten Halmahera Utara, Provinsi Maluku Utara. *Dintek*. 12(1), 1-9.
- Shi, G., Liao, Y., Su, B., Zhang, Y., Wang, W. & Xi, J. (2019). Kinetics of copper extraction from copper smelting slag by pressure oxidative leaching with sulfuric acid. *Journal Pre-proofs. Separation and Purification Technology*. 1-17.
- Sunstone. (2020). FR-4 PCB Materials. Sunstone Circuits [Internet]. Diperoleh dari <https://www.sunstone.com/pcb-manufacturingcapabilities/detailed-capabilities/pcb-materials/fr-4-material>
- Vogel. (1979). *Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis*. New York, US: Longman.
- Wahyono, S. (2013). Kebijakan pengelolaan limbah elektronik dalam lingkup global dan lokal. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. 14(1), 17-24.
- Wang, G.R., Liu, Y.Y., Tong, L.L., Jin, Z.N., Chen, G.B. & Yang, H.Y. (2019). Effect of temperature on leaching behavior of copper minerals with different occurrence states in complex copper oxide ores. *Trans. Nonferrous Met. Soc.* 29, 2192–2201.
- Wanta, K.C., Tanujaya, F.H., Susanti, R.F., Petrus, H.T., Perdana, I. & Astuti, W. (2018). Studi kinetika proses atmospheric pressure acid leaching bijih laterit limonit menggunakan larutan asam nitrat konsentrasi rendah. *Jurnal Rekayasa Proses*. 12(2), 77-84.
- Yuliusman. (2016). Pengambilan kembali logam Li dari limbah baterai Li-ION dengan teknologi *leaching* menggunakan asam sitrat. *SENTRA*. 1, 278-284.
- Zhang, X., Guan, J., Guo, Y., Yan, X., Yuan, H., Xu, J., Guo, J., Zhou, Y., Su, R. & Guo, Z. (2015). Selective desoldering separation of tin-lead alloy for dismantling of electronic components from printed circuit boards. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3, 1696-1700.



## THE EFFECTIVENESS OF CHLORINE TABLETS TO REDUCING COLIFORM IN WASTEWATER TREATMENT PLANT

Sri Arofah Mulyati<sup>1)\*</sup>, Maidaswar<sup>1)</sup>, Srikandi<sup>2)</sup>, Mia Azizah<sup>2)</sup>, Neneng Atikah<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur, Jl. Raya Pembangunan, Gunungsindur, Bogor 16340, Indonesia

<sup>2)</sup>Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Nusa Bangsa, Jl. KH. Sholeh Iskandar KM 4, Cimanggu, Tanah Sareal, Bogor 16166, Indonesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 Dec 2020,

Revised xx xxx 2021,

Accepted xx xxx 2021

Available online xx xxx 2021

#### Keywords:

- ✓ Coliform
- ✓ Chlorine
- ✓ Wastewater
- ✓ WWTP
- ✓ Quality standard

#### \*corresponding author:

[chiarofah@gmail.com](mailto:chiarofah@gmail.com)

Phone: +6285222308080

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.340>

### ABSTRACT

Wastewater originating from experimental animal cages that are not treated properly can be a source of pollution because it contains organic, inorganic materials and even pathogenic microorganisms. Disinfection using chlorine is the last step in the wastewater treatment process to reduce microorganisms. This study aimed to determine the effectiveness of chlorine tablets in reducing the content of Coliform from experimental animal cage wastewater at the Wastewater Treatment Plant (WWTP) to meet the Total Coliform quality standard in the Regulation of the Minister of Environment and Forestry No. 68 of 2016 concerning domestic wastewater quality standards. The research was conducted using laboratory experiments pre and post-test. Wastewater samples were taken from 2 points, namely, the point inlet (before treatment) and outlet (after chlorination), the MPN test Coliform (SNI 2897 2008) were repeated twice, and the measured pH and temperature to analyze environmental factors. The results showed that 200 g of chlorine tablets could effectively reduce Coliform up to 98.55% and meet the quality standards used as a reference.

### ABSTRAK

#### Efektivitas Tablet Klorin Dalam Menurunkan Kandungan Coliform Pada Instalasi Pengolahan Air Limbah

Air limbah yang berasal dari kandang hewan coba yang tidak diolah dengan tepat dapat menjadi sumber pencemaran karena mengandung bahan organik, anorganik bahkan mikroorganisme *pathogen*. Desinfeksi menggunakan klorin merupakan tahapan terakhir pada proses pengolahan air limbah untuk mengurangi mikroorganisme. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efektivitas tablet klorin dalam menurunkan kandungan Coliform dari air limbah kandang hewan coba di Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) agar memenuhi baku mutu Total Coliform dalam Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan No. 68 Tahun 2016 tentang baku mutu air limbah domestik. Penelitian dilakukan dengan menggunakan eksperimen laboratorium *pre* dan *post test*. Sampel air limbah diambil dari 2 titik yaitu titik *inlet* (sebelum pengolahan) dan *outlet* (sesudah klorinasi), uji MPN Coliform (SNI 2897 2008) dilakukan dua kali ulangan, serta mengukur pH dan suhu untuk menganalisis faktor lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan tablet klorin sebanyak 200 g efektif dapat menurunkan Coliform hingga 98,55 % dan memenuhi baku mutu yang dijadikan acuan.

Kata Kunci: Coliform, Klorin, air limbah, IPAL dan baku mutu.

## PENDAHULUAN

Air limbah merupakan pencemar terbesar yang masuk ke wilayah perairan, dan jika langsung di buang ke lingkungan tanpa pengolahan akan meningkatkan pencemaran (Susanthi *et al.*, 2018). Hal ini terjadi karena

komposisi air limbah rata-rata yang mengandung senyawa organik dan senyawa mineral berbentuk suspensi atau bahan terlarut bahkan organisme *pathogen* sehingga berpotensi untuk menjadi sumber pencemaran (Astika *et al.*, 2017). Bakteri *Coliform* merupakan bakteri yang dapat ditemukan pada air limbah yang bersumber dari



kandang hewan coba karena bercampurnya air sisa pencucian kandang dengan feses hewan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengolahan pada Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) sebelum dibuang ke lingkungan (Widyastuti *et al.*, 2013).

Bakteri *Coliform* merupakan mikroorganisme indikator yang menentukan kualitas sumber air yang tercemar (Pakpahan *et al.*, 2015). Bakteri *Coliform* adalah bakteri berbentuk batang, gram negatif, mampu memfermentasi laktosa serta membentuk asam dan gas pada suhu 37 °C. Contoh bakteri *Coliform* antara lain *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* sp. (Wiliantari *et al.*, 2018). Total *Coliform* digunakan sebagai parameter standar mutu mikrobiologi karena keberadaannya berkorelasi positif dengan keberadaan mikroorganisme *pathogen*. Untuk mengurangi atau bahkan membunuh mikroorganisme dalam air limbah, digunakan desinfektan untuk meningkatkan kualitas bakteriologisnya sehingga jumlah mikroorganisme yang terkandung didalamnya berkurang (Agung *et al.*, 2009). Klorin merupakan desinfektan yang umum digunakan pada proses pengolahan air, karena ekonomis dan mudah didapat, namun penggunaan klorin yang berlebih akan menimbulkan efek klinis (Widyaningsih *et al.*, 2016). Efektivitas dari penggunaan klorin perlu diketahui sehingga bahaya yang ditimbulkan dapat diminimalisir (Agung, 2009).

Instansi 'X' memiliki fasilitas IPAL *System Contact Aeration* atau *Submerged Fixed Film Bioreactor (ASFF)* untuk mengolah air limbah dengan volume harian 49 m<sup>3</sup> bersumber dari kandang hewan percobaan dan wastafel bangunan utama. Desinfektan yang digunakan pada bak klorinasi di IPAL tersebut adalah tablet klorin 200 g berkadar 90%. Berdasarkan penelitian pendahuluan, pada penggunaan tablet klorin sebanyak 400 g diperoleh nilai penurunan *Coliform* dari >1,1 x 10<sup>5</sup> sel/100 mL menjadi 0 sel/100 mL, sehingga dijadikan dasar untuk menurunkan massa klorin dalam memenuhi baku mutu yang dijadikan acuan.

Supriyadi (2010) menyatakan bahwa dosis optimum klorin untuk menurunkan kandungan bakteri *Coliform* total dan *Escherichia coli* pada sampel air sungai Garang, sungai Kreo dan sungai Tugu Soeharto sebesar 3,5 mg/L dengan efisiensi tercapai 100% pada dosis 4 mg/L (Supriyadi. *et al.*, 2010). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa penggunaan klorin dari

limbah domestik pada bak *clarifier* (ember penjernih air), menghasilkan kualitas air dengan parameter *E. coli* sebesar 0 MPN/100 mL pada penambahan dosis 350 ppm dan 400 ppm (Ratnawati & Sugito, 2013). Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dianalisis jumlah tablet klorin yang efektif dalam memenuhi Total *Coliform* yang diperkenankan berdasarkan baku mutu Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan No. 68 Tahun 2016 Tentang Baku Mutu Air Limbah Domestik dimana batas maksimum *Coliform* sebesar 3000 (Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan, 2016).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air limbah yang bersumber dari kandang hewan percobaan dan *lavatory* dengan debit harian 40 m<sup>3</sup> dengan kadar BOD 200 mg/L serta dari wastafel bangunan utama sebanyak 9 m<sup>3</sup> dengan BOD maksimum 50 mg/L. Selanjutnya bahan-bahan lain yang digunakan adalah media *Buffered Pepton Water* (BPW) merk Himedia™, media *Lauryl Tryptose Broth* (LSTB) merk Oxoid™, media *Brilliant Green Bile Broth* (BGLB) merk Oxoid™ dan air demineralisasi hasil produksi mesin Organo™.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan elektrik Shimadzu Libror EB 3300 HW, pH meter merk Horiba Laqua F74 BW, pH meter *portable*, thermometer air raksa, *autoclave* Hirayama, *Biosafety Cabinet Level 2* ESCO *Labculture*, *incubator* Memmert, *magnetic stirrer* merk Iuchi, *vortex mixer* merk Biosan, *automatic pipette jet* merk Eppendorf, *ose sterilizer* merk Etna Glowzone, rak tabung, botol *Durran*, gelas ukur, pipet volumetrik, kertas timbang, sendok takar, labu *Erlenmeyer*, tabung reaksi, tabung Durham, *Petri disc*, dan alat pelindung diri.

### Metode

Jenis penelitian berbasis eksperimen dengan metode *pre* dan *post test*. Sampel yang digunakan adalah air limbah kandang hewan coba dari 2 (dua) titik yaitu titik *inlet* (sebelum pengolahan di IPAL) dan *outlet* (telah mendapatkan perlakuan klorinasi di IPAL) dengan penambahan variasi tablet klorin sebanyak 100, 200, 300 dan 400 g. Metode yang digunakan mengacu pada SNI 2897:2008 tentang

uji *Most Probable Number* (MPN) *Coliform* menggunakan 2 tahapan pengujian yakni uji pendugaan (*presumptive test*) dan uji penegasan (*confirmed test*) (BSN, 2008). Langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini yakni:

#### **Aplikasi Tablet Klorin Pada Bak Klorinasi di IPAL dengan variasi 100, 200, 300 dan 400 g.**

Aplikasi tablet klorin pada IPAL dilakukan dengan cara membuka tutup bak klorinasi kemudian menambahkan tablet klorin dengan variasi 100, 200, 300, dan 400 g. Pada masing-masing aplikasi tablet klorin diberikan waktu jeda untuk meminimalisir sisa efek aplikasi tablet klorin sebelumnya.

#### **Pengambilan Sampel Air Limbah**

Sampel air diambil dari titik *inlet* dan *outlet* IPAL menggunakan botol durham steril sebanyak masing-masing 100 mL. Setiap sampel dari bak *inlet* dan bak *outlet* diambil masing-masing 2 botol. Kemudian sampel air limbah di bawa ke laboratorium untuk dilakukan pengujian *Coliform*. Sampel yang akan diuji tidak boleh lebih dari 24 jam setelah pengambilan. Pada masing-masing sampel dilakukan pengukuran pH dan suhu secara duplo untuk mengetahui faktor lingkungan.

#### **Pengujian MPN *Coliform***

Pengujian dilakukan menggunakan metode MPN dengan 2 (dua) tahapan pengujian meliputi uji praduga dan uji penegasan pada media spesifik. Uji MPN pada penelitian ini menggunakan ragam 333 (9 tabung) yang merupakan ragam alternatif dalam uji MPN.

Pada tahapan uji praduga dilakukan pengenceran menggunakan media *Buffered Pepton Water* (BPW) hingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dan  $10^{-3}$ . Selanjutnya dari masing-masing pengenceran tersebut didistribusikan masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 3 tabung media *Lauryl Sulphate Broth* (LSTB) 9 mL dan diinkubasikan selama 24-48 jam dan diamati adanya gas pada tabung durham. Jika pada uji praduga positif maka dilakukan uji konfirmasi, dan jika hasil uji praduga negatif maka pengujian dikatakan selesai (Amelia, 2019; Suriaman & Apriliasari 2017).

Pada uji konfirmasi dari masing-masing tabung yang diduga positif *Coliform* diambil sebanyak 1 (satu) ose untuk selanjutnya diinokulasikan ke dalam media BGLB dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24-48 jam untuk melihat adanya gas pada tabung durham.

Hal ini memperkuat keberadaan *Coliform* pada sampel air. Hasil uji MPN kemudian dikonfirmasi ke dalam tabel MPN seri 3 (tiga) tabung dalam *Bacteriological Analytical Manual* Edisi 8.

Hasil positif pada uji praduga ditandai dengan adanya gas pada tabung durham (10% atau lebih dari volume tabung durham) serta perubahan warna media LSTB dari kuning bening ke kuning keruh. Hal ini disebabkan karena bakteri *Coliform* memfermentasi laktosa yang terdapat dalam media cair LSTB yang menghasilkan asam piruvat dan asam asetat sehingga muncul gelembung gas CO<sub>2</sub> yang terperangkap dalam tabung durham yang terbalik (Putri & Kurnia, 2018). Sedangkan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung gas pada tabung durham. Hasil pada uji praduga ini memiliki probabilitas rendah, sehingga pengujian dilanjutkan ke uji konfirmasi pada media BGLB (Jiwintarum *et al.*, 2017). Media BGLB dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif sehingga hanya bakteri *Coliform* saja yang dapat tumbuh. Media ini mengandung laktosa dan garam empedu sehingga *Coliform* dapat tumbuh secara optimal.

#### **Analisis Data**

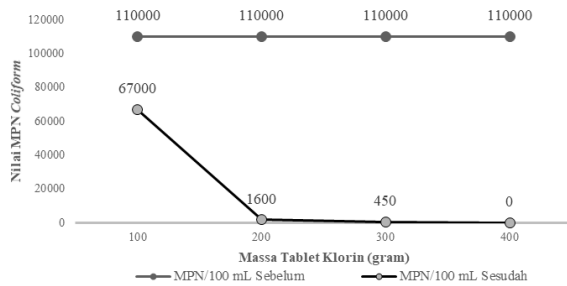
Jumlah *Coliform* yang diperoleh dari tabel MPN seri 3 (tiga) tabung kemudian dihitung menggunakan rumus di bawah ini (Kartikasari *et al.*, 2019).

$$\text{Jumlah Koloni/100 mL} = \text{Nilai MPN tabel} \times \frac{1}{\text{Pengenceran di tengah}}$$

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Nilai *Most Probable Number* (MPN) Air Limbah**

Metode *Most Probable Number* (MPN) merupakan metode uji kualitas air atau bahan pangan olahan untuk menghitung jumlah perkiraan mikroorganisme terdekat pada sampel uji dengan menggunakan medium cair tertentu. Hasil positif pada uji ini ditandai dengan adanya gas sebanyak 10% atau lebih dari volume tabung durham yang disimpan terbalik dalam tabung reaksi. Metode MPN merupakan metode yang paling sensitif untuk mendeteksi keberadaan *Coliform* dalam batas yang rendah (Aminah & Wahyuni, 2018). Nilai MPN *Coliform* sebelum dan sesudah klorinasi dapat dilihat pada Gambar 1.



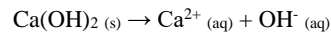
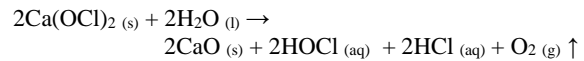
Gambar 1. Nilai MPN *Coliform* sebelum dan sesudah klorinasi

Berdasarkan hasil pada Gambar 1, sampel air limbah pada *inlet* di IPAL memiliki nilai MPN >110000 sel/100 mL (>1,1 x 10<sup>5</sup>), sehingga tidak memenuhi baku mutu yang dipersyaratkan yaitu 3000 sel/100 mL. Nilai MPN *Coliform* air limbah yang tinggi di Instansi 'X' disebabkan oleh sumber air limbah yang bercampur dengan air pencucian dan belum mengalami serangkaian pengolahan pada IPAL, sehingga untuk meningkatkan mutu secara bakteriologis perlu dilakukan pengolahan sebelum dibuang ke lingkungan atau badan air (Sulistiyawati, 2019). Sementara itu, setelah diberikan tablet klorin dengan variasi 100, 200, 300 dan 400 g, nilai MPN *Coliform* mengalami penurunan. Pada penambahan 100 g tablet klorin, nilai MPN turun dari >110000 sel/100 mL menjadi 67000 sel/100 mL. Sedangkan, pada penambahan tablet klorin 200 g, nilai MPN *Coliform* turun menjadi 1600 sel/100 mL. Pada penambahan 300 g tablet klorin, nilai MPN *Coliform* turun menjadi 450 sel/100 mL, sedangkan pada penambahan 400 g tablet klorin, nilai MPN turun menjadi 0 sel/100 mL. Berdasarkan hasil di atas dapat terlihat bahwa semakin tinggi massa klorin yang diberikan pada bak klorinasi IPAL, maka semakin tinggi penurunan jumlah MPN *Coliform*. Untuk memenuhi baku mutu yang digunakan yakni nilai MPN *Coliform* 3000 sel/100 mL, maka penambahan tablet klorin 200 g adalah yang paling efektif dengan nilai MPN 1600 sel/100 mL. Penambahan tablet klorin pada bak klorinasi dapat mengurangi *Coliform* hingga 100% terlihat pada penambahan tablet klorin sebanyak 400 g.

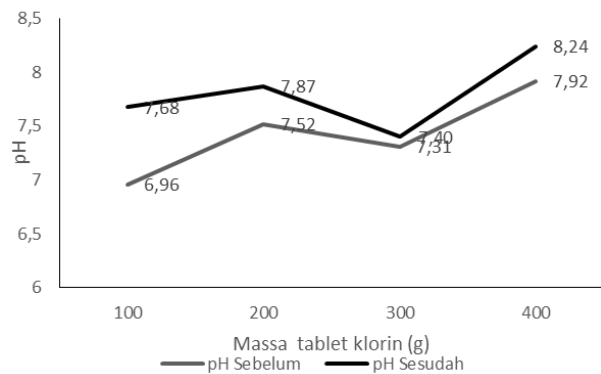
**Derajat Keasaman (pH)**

Derajat keasaman (pH) rata-rata meningkat setelah klorinasi pada IPAL (Gambar 2). Perubahan pH yang cenderung basa disebabkan oleh penambahan klorin, semakin banyak klorin yang ditambahkan maka pH air

meningkat (Sawyer, 2003). Reaksi yang terjadi dapat dilihat seperti berikut ini:



Klorin di dalam air akan terhidrolisis dan membentuk senyawa Ca(OH)<sub>2</sub> (basa kuat) dan HOCl (basa lemah), kemudian senyawa Ca(OH)<sub>2</sub> akan terurai membentuk ion Ca<sup>2+</sup> dan ion OH<sup>-</sup> yang mengakibatkan larutan bersifat basa. Hal ini disebabkan oleh keberadaan ion OH<sup>-</sup> yang lebih besar dibandingkan ion H<sup>+</sup> (Sawyer, 2003). Pada penelitian ini, pH air limbah berada dalam rentang 6-9, sehingga masih memenuhi baku mutu yang dipersyaratkan. Klorin efektif mendisinfeksi air yang memiliki pH netral, jika pH melebihi 8,5 asam hipoklorit akan terionisasi menjadi hipoklorit sehingga mengurangi efektivitas klorin sebagai desinfektan (Suri, 2019). pH merupakan kontrol dari klorinasi, pH yang terlalu rendah bersifat korosif, sehingga mengakibatkan korosi, sedangkan pH yang terlalu tinggi bersifat kaustik.

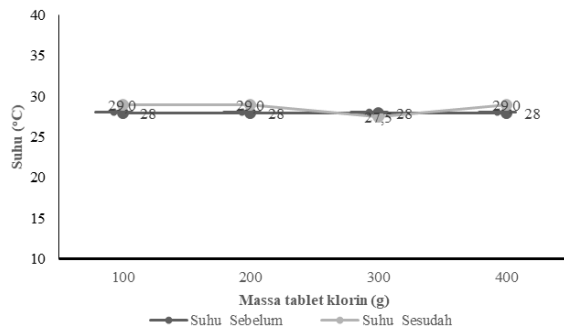


Gambar 2. Pengukuran pH air limbah sebelum dan sesudah klorinasi

**Suhu**

Suhu rata-rata air limbah setelah klorinasi meningkat (Gambar 3), hal ini dapat disebabkan oleh adanya udara yang masuk ke bak klorinasi saat tutupnya dibuka, adanya pengaruh dari suhu lingkungan saat pengambilan sampel air. Peningkatan suhu juga dapat disebabkan oleh aktivitas desinfeksi dari tablet klorin yang digunakan, karena semakin efektif proses klorinasi, maka suhu akan naik yang akan mempercepat proses desinfeksi air limbah (Nugrayanti *et al.*, 2018). Pada penambahan tablet klorin 300 gram suhu mengalami penurunan hal ini disebabkan oleh factor lingkungan saat pengambilan sampel. Menurut

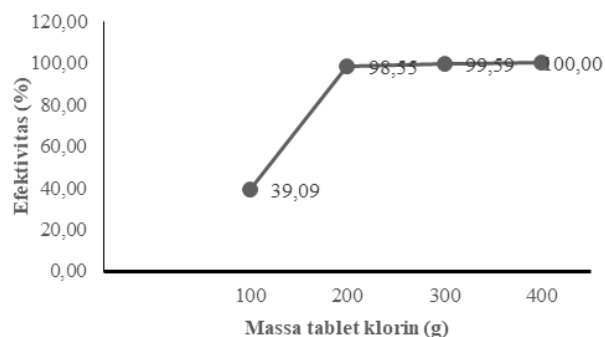
Kerubun (2014) suhu air limbah terklorinasi lebih tinggi dari suhu sebelum pengolahan, hal ini disebabkan penggunaan bahan kimia organik maupun anorganik (Kerubun, 2014). Hasil pengukuran suhu air limbah sebelum dan sesudah klorinasi masih memenuhi baku mutu yaitu kurang dari 30 °C sebagaimana dipersyaratkan dalam Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor Kep-51/MenLH/10/1995 yakni maksimal 30 °C.



Gambar 3. Pengukuran suhu air limbah sebelum dan etelah klorinasi

#### Nilai Efektiviatas Tablet Klorin Dalam Menurunkan *Coliform*

Nilai MPN yang diperoleh berdasarkan uji MPN *Coliform*, kemudian dihitung untuk memperoleh presentase efektivitas dari penggunaan tablet klorin terhadap penurunan *Coliform* air limbah. Selanjutnya, hasil tersebut dibandingkan dengan batas maksimal nilai MPN *Coliform* pada baku mutu yang dijadikan acuan. Nilai efektivitas tablet klorin terhadap penurunan kandungan *Coliform* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Nilai efektivitas tablet klorin dalam menurunkan *Coliform*

Tablet klorin 400 g memiliki daya bunuh paling efektif (100%) (Gambar 4) dengan nilai

MPN 0 sel/100 mL (Gambar 1.). Sedangkan tablet klorin yang paling efektif dalam memenuhi baku mutu Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan No. 68 Tahun 2016 adalah tablet klorin 200 g dengan nilai MPN 1600 sel/100 ml (98,55%). Penggunaan klorin dalam bak klorinasi merupakan cara yang efektif untuk mengurangi kontaminasi *Coliform* karena khasiatnya sebagai desinfektan mampu merusak sel bakteri, merusak asam nukleat dan enzim (Busyairi *et al.*, 2016).

Selain berperan sebagai desinfektan, klorin juga dapat memberikan dampak negatif bagi lingkungan yaitu menjadi limbah sehingga tablet klorin 400 gram bukan pilihan yang tepat dalam menurunkan kandungan *Coliform* air limbah kandang hewan coba di Instansi 'X', karena tablet klorin 200 gram efektif 98.55% menurunkan *Coliform* dalam memenuhi baku mutu yang dijadikan acuan. Limbah cair yang mengandung klorin dapat mencemari perairan dan ekosistem di dalamnya. Besarnya pengaruh tergantung pada tingkat dan jenis senyawa serta tingkat toksisitasnya. Klorin menghasilkan senyawa organoklorin seperti *Polychlorinated Biphenyls* (PCBs), dioksin, *Dichloro Dietil Trichloromethana* (DDT) dan lain-lain yang dapat mengganggu kekebalan, merusak hati dan ginjal, gangguan pencernaan, gangguan sistem saraf, gangguan sistem reproduksi bahkan kanker (Hasan, 2006). Oleh karena itu, penggunaan klorin yang efektif bertujuan untuk mengendalikan atau mengurangi residu klorin yaitu senyawa halogen organik dan trihalometana (THM) (Busyairi *et al.*, 2016).

## KESIMPULAN

MPN *Coliform* pada titik inlet IPAL yaitu sebesar >110000 sel/100 mL ( $>1,1 \times 10^5$ ) sehingga tidak memenuhi baku mutu yang dipersyaratkan yaitu 3000 sel/100 mL. Nilai MPN *Coliform* air limbah pada titik inlet yang tinggi disebabkan oleh sumber air limbah kandang hewan coba yang bercampur dengan air pencucian dan belum mengalami serangkaian pengolahan pada IPAL, sehingga untuk meningkatkan mutu air limbah secara bakteriologis, perlu dilakukan pengolahan terlebih dahulu sebelum di buang ke lingkungan atau badan air.

Penambahan tablet klorin dengan variasi 100, 200, 300 dan 400 g pada bak klorinasi di IPAL dapat mengurangi Total *Coliform* pada air

limbah yang bersumber dari kandang hewan coba di Instansi 'X' dengan efektifitas 100% pada tablet klorin 400 g dengan jumlah *Coliform* diperoleh 0 sel/100 mL. Sedangkan untuk memenuhi baku mutu yang ditetapkan dalam Peraturan Menteri Lingkungan Hidup dan Kehutanan No.68 Tahun 2016 adalah tablet klorin 200 g dengan efektifitas 98.55% yakni Total *Coliform* diperoleh  $1,6 \times 10^3$  sel/100 mL.

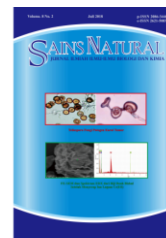
### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur Kabupaten Bogor, atas izin yang diberikan untuk dilakukan penelitian pada Instalasi Pengolahan Air Limbah. Selain itu penulis mengucapkan terima kasih pada laboran di Unit Uji Bakteriologi dan *Supply Centre*.

### DAFTAR PUSTAKA

- Agung, T. U., Kadar, A., Pada, K., Dan, A., Limbah, A., & Metode, D. (2009). *Analisis Kadar Klorida Pada Air Dan Air Limbah Dengan Metode Argentometri*. Karya Tulis Ilmiah. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Amelia, F. (2019). Identifikasi Bakteri Coliform Pada Air Minum Dalam Kemasan (AMDK) Yang Diproduksi Di Kota Batam. *Simbiosis*, 8(1), 85. <https://doi.org/10.33373/sim-bio.v8i1.1907>
- Aminah, S., & Wahyuni, S. (2018). Hubungan Konstruksi Sumur Dan Jarak Sumber Pencemaran Terhadap Total Coliform Air Sumur Gali Di Dusun 3A Desa Karang Anyar Kecamatan Jati Agung Kabupaten Lampung Selatan Relationship Construction Well And Distance Source Pollution Against Total Coliform W. *Jurnal Analisis Kesehatan*, 7(1), 1–6. [ejournal.poltekkes-tjk.ac.id/index.php/JANALISKES/article/view/921](http://ejournal.poltekkes-tjk.ac.id/index.php/JANALISKES/article/view/921)
- Astika, A. U. W., Sudarno, S., & Zaman, B. (2017). Kajian Kinerja Bak Settler, Anaerobic Baffled Reactor (Abr), Dan Anaerobic Filter (Af) Pada Tiga Tipe Ipal Di Semarang. *Jurnal Teknik Lingkungan*, 6(1), 1–15.
- Busyairi, M., Dewi, Y. P., & Widodo, D. I. (2016). Efektivitas Kaporit Pada Proses Klorinasi Terhadap Penurunan Bakteri Coliform Dari Limbah Cair Rumah Sakit X Samarinda (The Effectiveness of Calcium Hypochlorite to Chlorination Process in Decreasing the Amount of Coliform Bacteria in the Wastewater of X). *Jurnal Manusia Dan Lingkungan*, 23(2), 156. <https://doi.org/10.22146/jml.18786>
- Hasan, A. (2006). Dampak penggunaan klorin. *J. Tek. Lingk. P3TL-BPPT*, 7(1), 90–96. <http://ejurnal.bppt.go.id/ejurnal2011/index.php/JTL/article/view/456/472>
- Badan Standardisasi Nasional [BSN]. (2008). *Metode pengujian cemaran mikroba dalam daging, telur dan susu, serta hasil olahannya*. BSN.
- Jiwintarum, Y., Agrijanti, & Septiana, B. L. (2017). Most Probable Number (Mpn) Coliform Dengan Variasi Volume Media Lactose Broth Single Strength (Lbss) Dan Lactose Broth Double Strength (Lbds). *Jurnal Kesehatan Prima*, 11(1), 1.
- Kartikasari, A. M., Hamid, I. S., Purnama, M. T. E., Damayanti, R., Fikri, F., & Praja, R. N. (2019). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Escherichia coli Kontaminan Pada Daging Ayam Broiler Di Rumah Potong Ayam Kabupaten Lamongan. *Jurnal Medik Veteriner*, 2(1), 66. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol2.iss1.2019.66-71>
- Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. (2016). Peraturan Menteri LHK No.68 th 2016 tentang Baku Mutu Air Limbah Domestik. *Kementerian Lingkungan Hidup Dan Kehutanan*, 68, 1–13. [http://neo.kemenperin.go.id/files/hukum/19 Permen LHK th 2016 No. P.63 Baku Mutu Air Limbah Domestik.pdf](http://neo.kemenperin.go.id/files/hukum/19%20Permen%20LHK%20th%202016%20No.%20P.63%20Baku%20Mutu%20Air%20Limbah%20Domestik.pdf)
- Kerubun, A. A. (2014). Wastewater Quality in Tulehu Regional Public Hospital Ali. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 180–185.
- Nugrayanti, M. S., Dermawan, D., & Dewi, T. U. (2018). Pengaruh pemberian dosis trichloroisocyanuric acid (tcca) pada bak

- desinfeksi terhadap penurunan kandungan escherichia coli di RSUD Dr. R. Koesma Tuban. *Conference Proceeding on Waste Treatment Technology*, 1(1), 129–134.
- Pakpahan, R. S., Picauly, I., & Mahayasa, I. N. W. (2015). Cemaran Mikroba Escherichia coli dan Total Bakteri Koliform pada Air Minum Isi Ulang. *Kesmas: National Public Health Journal*, 9(4), 300. <https://doi.org/10.21109/kesmas.v9i4.733>
- Putri, A. M., & Kurnia, P. (2018). Identifikasi Keberadaan Bakteri Coliform Dan Total Mikroba Dalam Es Dung-Dung Di Sekitar Kampus Universitas Muhammadiyah Surakarta. *Media Gizi Indonesia*, 13(1), 41. <https://doi.org/10.20473/mgi.v13i1.41-48>
- Ratnawati, R., & Sugito. (2013). Proses Desinfeksi Pada Pengolahan Air Limbah Domestik Menjadi Air Bersih Sebagai Air Baku Air Minum. *Jurnal Teknik*, 11(2), 2–4.
- Sulistiyawati, I. (2019). Kuantitas Total Bakteri Coliform pada Instalasi Pengolahan Limbah Cair Medis Laboratorium Klinik. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*, 19(3), 675. <https://doi.org/10.33087/jiubj.v19i3.718>
- Supriyadi., Sumantri, I., & Hartati., I. (2010). Pengaruh Dosis Klorin Pada Pertumbuhan Bakteri Coliform Total Dan Escherichia Coli Pada Sungai Kreo, Sungai Garang Dan Sungai Tugu Suharto. *Banlit Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang*, 12(1), 30–35.
- Suriaman, E., & Apriliasari, W. P. (2017). Uji Mpn Coliform Dan Identifikasi Fungi Patogen Pada Air Kolam Renang Di Kota Malang. *Jurnal SainHealth*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.51804/jsh.v1i1.73.15-22>
- Susanthi, D., Purwanto, M. Y., & Suprihatin, S. (2018). Evaluasi Pengolahan Air Limbah Domestik dengan IPAL Komunal di Kota Bogor. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 19(2), 229. <https://doi.org/10.29122/jtl.v19i2.2834>
- Widyaningsih, W., Supriharyono, S., & Widyorini, N. (2016). Analisis Total Bakteri Coliform Di Perairan Muara Kali Wisu Jepara. *Management of Aquatic Resources Journal (MAQUARES)*, 5(3), 157–164. <https://doi.org/10.14710/marj.v5i3.14403>
- Widyastuti, F. R., Purwanto, & Hadiyanto. (2013). Upaya pengelolaan lingkungan usaha peternakan sapi di Kawasan Usahatani Terpadu Bangka Botanical Garden Pangkalpinang. *Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan Sumber Daya Alam Dan Lingkungan Dalam Mewujudkan Pembangunan Berkelanjutan*, 237, 81–85. <http://www.psil.undip.ac.id>
- Wiliantari, P., Besung, I. N. K., & Tono PG, K. (2018). Bakteri Coliform dan Non Coliform yang Diisolasi dari Saluran Pernapasan Sapi Bali. *Buletin Veteriner Udayana*, 10(1), 40. <https://doi.org/10.24843/bulvet.2018.v10.i01.p06>
- Suri, P.M. (2019). *Analisa Kadar Klorin Pada Air Kolam Renang Deli di Kota Medan*. Karya Tulis Ilmiah. Politeknik Kesehatan Kemenkes. Medan. 87(1,2), 149–200.



## DETERMINATION OF NITRITE AND NITRATE LEVEL IN WASTEWATER DISCHARGE FROM SMOKED FISH INDUSTRY

Wina Yulianti<sup>1)</sup>, Ima Kusumanti<sup>2)\*</sup> dan Nurul Jannah<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Analisis Kimia, IPB, Jl. Kumpang No.14, Cilibende, Bogor 16128, Indonesia

<sup>2)</sup>Program Studi Teknologi Produksi dan Manajemen Budidaya Perikanan, IPB, Jl. Kumpang No.14, Cilibende, Bogor 16128, Indonesia

<sup>3)</sup>Program Studi Teknik Manajemen Lingkungan, IPB, Jl. Kumpang No.14, Cilibende, Bogor 16128, Indonesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 Dec 2020,

Revised xx xxx 2021,

Accepted xx xxx 2021

Available online xx xxx 2021

#### Keywords:

- ✓ Alo River
- ✓ nitrate
- ✓ nitrite
- ✓ smoked fish
- ✓ spectrophotometer

\*corresponding author:

[wjuans@apps.ipb.ac.id](mailto:wjuans@apps.ipb.ac.id)

Phone: +628121918444

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.323>

### ABSTRACT

*This research aimed to determine nitrite and nitrate contamination in wastewater discharge from the smoked fish industry around the fishpond area in Penatarsewu village, Sidoarjo East Java. Samples were taken from ten locations along The Alo River from September to November 2020. Nitrate and nitrite levels were determined by the Standard Method for Examination of Water and Wastewater 4500-NO<sub>2</sub>-B dan 4500-NO<sub>3</sub>-B. Nitrite formed a reddishpurple azo dye produced by coupling diazotized sulfanilamide with N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride after a visible spectrophotometer measured the complexes nitrite at wavelength 543 nm. Meanwhile, the Nitrate level was determined by ultraviolet spectrophotometer at a wavelength of 220 nm. The standard nitrite calibration curve was shown by the line equation  $y = 3,30361x - 0,0028$  and a determination coefficient of 0,9999. Whereas the standard nitrate was showed by the line equation  $y = 0,2507x + 0,0067$  and a determination coefficient 0,9996. The level of nitrate and nitrite in the sample ranged from 0,05-0,93 mg / L 1,2-1,6 mg / L. According to a quality standard threshold value for nitrite and nitrate-based on the Government Regulation of the Republic of Indonesia (PPRI) No.82 2001 is 0,06mg/L and 10 mg/L, therefore it can be concluded that some samples are above the threshold value for nitrite level*

### ABSTRAK

#### Penentuan Kadar Nitrit dan Nitrat Pembuangan Limbah Cair Industri Ikan Asap

Penelitian bertujuan untuk menentukan tingkat kontaminasi nitrat dan nitrit pada limbah industri ikan asap di sekitar kawasan tambak ikan asap di Desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur. Sampel diambil dari 10 titik di areal sekitar tambak sepanjang badan Sungai Alo pada bulan September sampai November 2020. Penentuan kadar nitrat dan nitrit mengacu pada *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater* 4500-NO<sub>2</sub>-B dan 4500-NO<sub>3</sub>-B. Nitrit membentuk kompleks ungu kemerahan yang dihasilkan dari kopling sulfanilamida dengan N-(1-naptil)-etilena-diamina dihidroklorida kemudian kadarnya ditentukan dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 543 nm. Kadar nitrat ditentukan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 220 nm. Hasil pengukuran standar nitrit menghasilkan persamaan garis  $y = 3,30361x - 0,0028$  dengan koefisien determinasi 0,999 dan standar nitrat menghasilkan persamaan garis  $y = 0,2507x + 0,0067$  dengan koefisien determinasi 0,9996. Kadar nitrit dan nitrat secara berturut-turut berkisar antara 0,05-0,93 mg/L dan 1,2-1,6 mg/L. Berdasarkan nilai ambang batas baku mutu nitrit dan nitrat berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PPRI) No.82 tahun 2001 adalah 0,06 mg/L dan 10 mg/L, maka dapat disimpulkan bahwa beberapa sampel mengandung kadar nitrit di atas ambang batas.

Kata kunci : ikan asap, nitrat, nitrit, Sungai Alo, spektrofotometer

### PENDAHULUAN

Sektor perikanan sangat berperan penting dalam pemenuhan kebutuhan pangan di

Indonesia. Namun dalam pemenuhan kebutuhan pangan tersebut, pengolahan ikan memiliki keterbatasan dalam hal umur simpannya. Ikan merupakan zat organik yang mudah membusuk,



dengan demikian berbagai upaya pengolahan ikan dilakukan untuk memperpanjang umur simpannya. Pengolahan ikan juga bertujuan untuk dapat meningkatkan citra rasa sehingga menghasilkan produk yang lebih menarik minat konsumen dan dapat meningkatkan nilai ekonomis.

Industri pengolahan ikan dapat dibagi menjadi proses industri pembekuan, pengasapan, penepungan, pembuatan minyak ikan dan pengalengan (Setiadi *et al.*, 2019). Teknik pengolahan ikan yang dilakukan di desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur adalah pengasapan ikan. Lebih dari 90% masyarakatnya menggantungkan kehidupannya dari pengolahan ikan asap mujair (Kusumanti *et al.*, 2021). Teknik pengasapan ikan adalah salah satu teknik pengawetan makanan yang tertua di dunia. Tujuan utama pengasapan ikan adalah untuk mengeringkan ikan sehingga ikan sukar teroksidasi dan memperlambat proses pembusukan (Setiadi *et al.*, 2019). Kelompok senyawa kimia dalam asap kayu yaitu karbonil (aldehida dan keton), asam organik, fenolik, basa organik, alkohol, hidrokarbon, gas CO<sub>2</sub>, CO, O<sub>2</sub>, dan nitrogen. Beberapa senyawa asap tersebut bersifat antioksidan dan bakterisidal (Sulistijowati *et al.*, 2011).

Proses pengasapan ikan terdiri dari tahapan pencucian, penggaraman dan pengasapan. Pada tahapan pencucian dilakukan proses pemotongan sirip, ekor, kepala, pengeluaran isi perut. Ikan kemudian dibersihkan sebelum dilakukan penggaraman. Proses penggaraman dilakukan sampai garam meresap ke dalam daging. Tahap selanjutnya adalah proses pengeringan dan pengasapan. Terdapat tiga tahap pada proses pengasapan, yaitu pengeringan, pengasapan, pemasakan awal dan pematangan ikan (Suhu 80 °C) (Setiadi *et al.*, 2019).

Permasalahan yang sering muncul dari kegiatan industri perikanan adalah kurangnya perhatian terhadap air limbah sisa pengolahan ikan. Air sisa produksi berwarna kecoklatan keruh, berbau amis dibuang ke badan sungai tanpa dilakukan pengolahan terlebih dahulu. Limbah air tersebut mengandung berbagai macam bahan organik yang tinggi, seperti sisa isi perut, sisa daging, darah, lemak, karbohidrat dan protein (Saputra *et al.*, 2016). Tingginya bahan organik pada limbah air tersebut dapat mempengaruhi perkembangan mikroorganisme. Dengan demikian pemantauan karakteristik limbah mencakup parameter fisika dan kimia

menjadi faktor yang sangat penting untuk dianalisis

Salah satu parameter kimia penentu kualitas air adalah nitrogen. Unsur nitrogen merupakan salah satu unsur yang berperan sebagai penentu produktivitas air. Produktivitas air dalam menghasilkan material organik sangat berperan dalam mempertahankan keberlangsungan biota akuatik. Produktivitas yang relatif tinggi diperlukan untuk kehidupan ikan dan berfungsi sebagai dasar rantai makanan dan ekosistem perairan. Namun produksi yang berlebihan mengakibatkan pembusukan biomassa yang dihasilkan, tingginya konsumsi oksigen terlarut akan menghasilkan aroma air yang tidak enak (Dey *et al.* 2021). Tingginya kadar nitrogen juga dapat menyebabkan *eutrofikasi*. Proses *eutrofikasi* dapat terjadi jika kadar nitrogen melebihi 0,20 mg/L (Huang *et al.*, 2015).

Efek nitrat dan nitrit bagi manusia dilaporkan dapat menyebabkan *methemoglobinemia (blue syndrom)* (Dey *et al.* 2021). Nitrit dapat mengganggu sistem transformasi oksigen dalam tubuh, karena menyebabkan konversi irreversible hemoglobin menjadi methemoglobin dalam aliran darah, dimana kemampuan hemoglobin untuk menukar oksigen sangat terganggu. Efek nitrat yang lain adalah dapat menyebabkan kanker lambung yang dikaitkan dengan nitrosamine di perut yang diproduksi oleh tingginya kadar nitrat dan nitrit (Taziki *et al.*, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat kontaminasi nitrat dan nitrit pada badan air sungai di desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur sebagai dampak dari teknik pengolahan ikan dengan metode pengasapan. Penentuan kadar nitrat dan nitrit mengacu pada *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater* 4500-NO<sub>2</sub>-B dan 4500-NO<sub>3</sub>-B (American Public Health Association, 2017)

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi bahan uji dan bahan kimia. Bahan uji adalah sampel air yang diperoleh dari limbah air di sekitar area pembuangan pengolahan ikan asap. Bahan kimia yang digunakan adalah air bebas nitrit, HCl 1M, NH<sub>4</sub>OH 1M, NaNO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, KMnO<sub>4</sub> 0,05N, H<sub>2</sub>SO<sub>4p</sub>, Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0,025M, ferro ammonium sulfat 0,05M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%, sufamilamida, N-(1-naptil)-etilena-diamina dihidroklorida, KNO<sub>3</sub>.

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas, timbangan analitik, spektrofotometer UV-VIS.

gelombang 220 nm dengan akuades sebagai blanko.

**Metode**

**Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan September sampai November 2020. Lokasi pengambilan sampel terdiri dari sepuluh titik yang berlokasi di sepanjang sungai Alo desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur (Gambar 1). Sampel yang diambil ditempatkan dalam dirigen plastik ukuran 5L.

**Penentuan Kadar Nitrit**

Padatan yang tersuspensi dalam sampel dihilangkan terlebih dahulu dengan menyaring sampel ke dalam saringan membran 0,45 µM. Sampel yang sudah disaring kemudian diatur pHnya berkisar antara 5 sampai 9 menggunakan HCl 1 M atau NH<sub>4</sub>OH 1 M. 50 mL sampel ditambahkan dengan pereaksi pewarna dan dibiarkan stabil dengan kisaran waktu antara 10-60 menit. Standar dibuat dengan konsentrasi 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 mg/L. Standar diperlakukan sama dengan sampel. Sampel dan standar diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 543 nm.

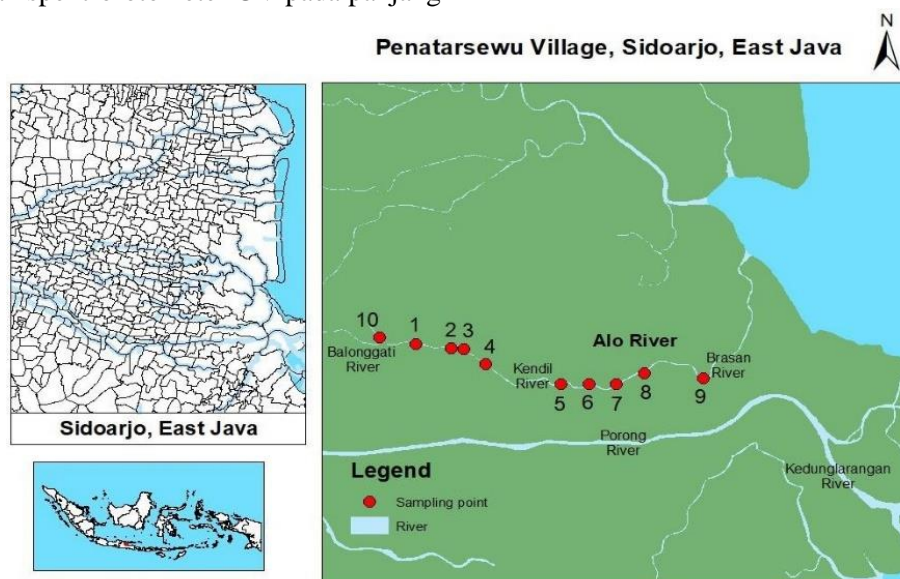
**Penentuan Kadar Nitrat**

Sampel terlebih dahulu disaring kemudian 50 mL sampel ditambahkan dengan HCl 1M dan diaduk. Standar yang digunakan adalah standar NO<sub>3</sub>-N dengan konsentrasi antara 0,1,2,3,4,5 mg/L. Serapan sampel dan standar diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

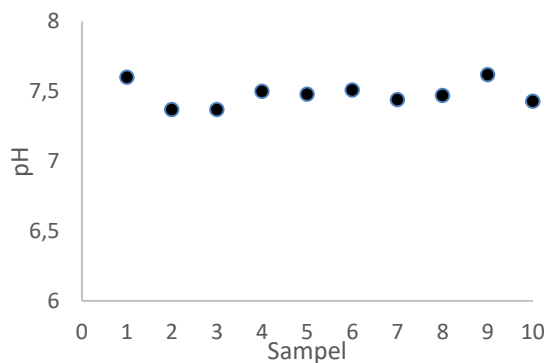
Pengambilan sampel air berlokasi di daerah sekitar tambak ikan sepanjang sungai Alo desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur. Titik pengambilan sampel mengarah ke laut. Masyarakat di sekitaran tambak umumnya melakukan teknik pengasapan ikan untuk meningkatkan nilai tambah ikan. Hasil pengukuran pH menunjukkan bahwa pH sampel berkisar antara 7,37 sampai 7,62 (Gambar 1). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa sampel air memiliki pH yang baik. Berdasarkan nilai ambang batas PP RI No 82 Tahun 2010, Air dapat digunakan untuk prasarana/sarana rekreasi air, pembudidayaan ikan air tawar, peternakan, air untuk mengairi pertanian, dan atau peruntukan lain yang mempersyaratkan mutu air yang sama dengan kegunaan tersebut.

Penentuan kadar nitrat menggunakan metode spektrofotometri. Nitrit pada kondisi asam (pH antara 2 sampai 2,5) akan membentuk ungu kemerahan yang dihasilkan dari kopling sulfanilamida dengan N-(1-naptil)-etilena-diamina dihidroklorida. Kompleks yang terbentuk diukur serapannya menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 543 nm (American Public Health Association, 2017).

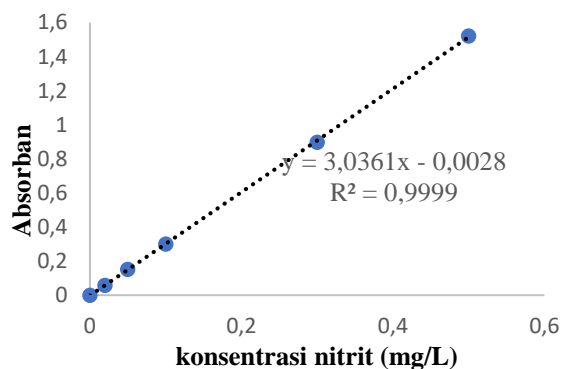


Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel

Standar yang digunakan pada penentuan kadar nitrat dibuat dengan konsentrasi 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,3 dan 0,5 mg/L. Persamaan matematika yang diperoleh pada pengukuran standar adalah  $y=3,30361x-0,0028$  dengan koefisien determinasi 0,999. Hubungan linier yang ideal ditunjukkan dengan nilai intersep 0 dan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) +1 atau -1 (Riyanto, 2014). Slope yang diperoleh dari persamaan adalah 3,30361 dan intersep -0,0028, Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit menunjukkan ketelitian yang tinggi dapat dilihat dari koefisien determinasi yang mendekati 1. Nilai slope yang besar dan intersep yang mendekati nol menunjukkan pengukuran memiliki sensitifitas yang tinggi (Gambar 3).



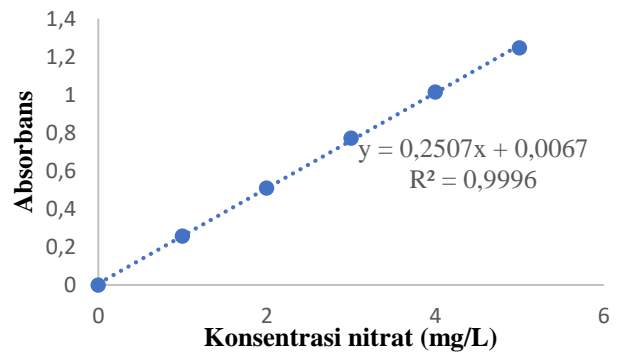
Gambar 2 Nilai pH sampel



Gambar 3. Kurva kalibrasi standar nitrit

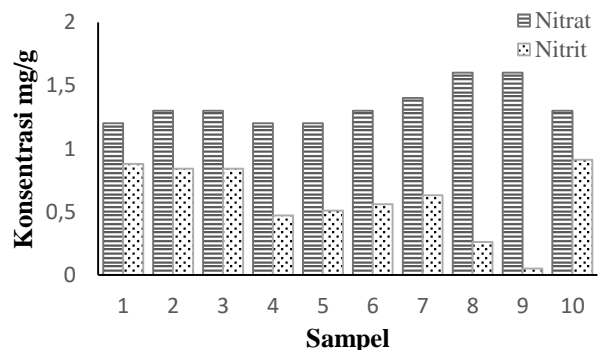
Pada penentuan nitrat, sampel tidak direaksikan dengan kompleks warna. Sampel diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 220 nm (American Public Health Association, 2017). Standar yang digunakan pada penentuan kadar nitrat dibuat dengan konsentrasi 0,1,2,3,4 dan 5 mg/L. Persamaan garis yang diperoleh pada pengukuran standar adalah  $y=0,2507x+0,0067$  dengan koefisien determinasi 0,9996. Hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan

konsentrasi analit menunjukkan ketelitian yang tinggi dapat dilihat dari koefisien determinasi yang mendekati 1. Nilai slope yang besar dan intersep yang mendekati nol menunjukkan pengukuran memiliki sensitifitas yang tinggi (Gambar 4).



Gambar 4. Kurva kalibrasi standar nitrat

Pada pengukuran sampel air sungai menunjukkan nilai kadar nitrat lebih tinggi dibandingkan dengan kadar nitrit. Nitrit adalah senyawa intermedit antara amonium dan nitrat. Amonium teroksidasi menjadi nitrit dan kemudian nitrit teroksidasi menjadi nitrat (Manahan, 2001). Nitrit umumnya ditemukan dalam jumlah yang kecil dibandingkan nitrat. Nitrit bersifat tidak stabil dan akan mengalami oksidasi menjadi nitrat melalui proses nitrifikasi. Dengan demikian berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa nitrogen pada sampel berada pada kondisi bilangan oksidasi tertinggi. Hasil analisis juga menunjukkan kecenderungan berbanding terbalik antara kadar nitrat dan nitrit. Hal ini bisa dilihat dari sampel 8 dan 9 menunjukkan kadar nitrit terendah, hal ini berbanding terbalik dengan kadar nitratnya yang menunjukkan kadar nitrat yang paling tinggi (Gambar 5).



Gambar 5. Kadar nitrit dan nitrat sampel

Kadar nitrit pada sampel menunjukkan nilai yang bervariasi. Sampel 9 menunjukkan kadar terendah 0,05mg/L dan sampel 10 menunjukkan kadar tertinggi 0,93mg/L.

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PPRI) No.82 tahun 2001, batas mutu kadar nitrat di dalam air adalah 0,06 mg/L (PP RI, 2001). Berdasarkan data yang diperoleh kadar nitrat sampel berada diatas baku mutu kecuali pada sampel 9. Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian yang dilaksanakan Saputra *et al.*, (2016). Air limbah pengolahan pengasapan ikan menyebabkan kadar nitrit berada di atas baku mutu. Tingginya kadar nitrit yang berada di atas baku mutu mengindikasikan jumlah terbatasnya jumlah oksigen terlarut dalam air sehingga nitrit tidak teroksidasi sempurna menjadi nitrat. Sedangkan pada sampel 9 hampir semua nitrit teroksidasi menjadi nitrat, dengan demikian dapat diperkirakan bahwa kandungan oksigen yang terkandung pada sampel 9 lebih tinggi dibandingkan pada sampel air lainnya. Kadar Nitrat pada sampel juga menunjukkan nilai yang bervariasi, yaitu berkisar antara 1,2 sampai 1,6 mg/L. Berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PPRI) No.82 tahun 2001, batas mutu kadar nitrat di dalam air adalah 10 mg/L. Dengan demikian, kadar Nitrat sampel berada di bawah nilai ambang batas.

Tingginya kadar nitrit hampir di semua sampel mengindikasikan bahwa aktifitas pengolahan ikan asap diduga berkontribusi pada peningkatan kadar nitrit. Kadar nitrit juga dapat dipengaruhi oleh masuknya limbah domestik atau aktivitas pemupukan lahan pertanian, aktivitas peternakan di sekitar area pengambilan sampel (Yogafanny, 2015). Nitrit merupakan salah satu parameter kimia untuk menentukan kualitas air. Tingginya kadar nitrit dapat menyebabkan *eutrofikasi* yang dapat mengganggu keseimbangan ekologi perairan

## KESIMPULAN

Tingkat kontaminasi nitrat dan nitrit pada badan air sungai di desa Penatarsewu, Sidoarjo, Jawa Timur menunjukkan nilai di atas baku mutu untuk nitrit dan di bawah baku mutu untuk nitrat berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia (PPRI) No.82 tahun 2001. Tingginya kadar nitrit hampir di semua sampel mengindikasikan bahwa aktifitas pengolahan ikan asap diduga berkontribusi pada peningkatan kadar nitrit.

## UCAPAN TERIMA KASIH

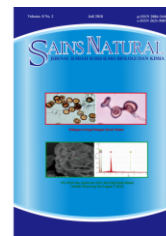
Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang sudah membantu kegiatan penelitian. Terimakasih diucapkan kepada Sekolah Vokasi IPB yang sudah memberikan dana hibah penelitian tahun 2020, Laboratorium PT Sucofindo, Jawa Timur yang sudah berkerjasama dalam menganalisis sampel dan Mahasiswa Program Studi Teknologi Produksi dan Manajemen Perikanan yang telah membantu pada saat sampling.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Public Health Association. (2017). Standard Methods. In R. Baird, A. D. Eaton., & E. W. Rice (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association.
- Dey S, Haripavan N, Basha SR, Babu GV. (2021). Removal of ammonia and nitrates from contaminated water by using solid waste bio-adsorbents. *Current Research in Chemical Biologi*. 2021.100005
- Huang, J., Yang, P., Li, C., Guo, Y., Lai, B., Wang, Y., Feng, L., & Zhang, Y. (2015). Effect of Nitrite and Nitrate Concentrations on the Performance of AFB-MFC Enriched with High-Strength Synthetic Wastewater. *Biotechnology Research International*, 2015, 1–6.
- Kusumanti, I., Yulianti, W., & Jannah, N. (2021). Physiochemical property of wastewater discharged from smoked fish industry around fishponds area in Penatarsewu Village, Sidoarjo, East Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 744(1), 012037.
- Manahan, S. E. (2001). Environmental chemistry. In *Energy* (8th ed.). CRC Press.
- PP RI. (2001). Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. *Peraturan Pemerintah Republik Indonesia*, 1–41.
- Riyanto, P. D. (2014). *Validasi & Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*.

DEEPUBLISH.

- Saputra, A. dony, Haerudin, & Widyorini, N. (2016). Efektivitas Kombinasi Mikroorganisme Dan Tumbuhan Air Lemna Minor Sebagai Bioremediator Dalam Mereduksi Senyawa Amoniak, Nitrit, Dan Nitrat Pada Limbah Pencucian Ikan. *Management of Aquatic Resources*, 5, 80–90.
- Setiadi, T., Ismail, G. A., & Watari, T. (2019). *Pedoman Pengolahan Air Limbah Industri Pengolahan Ikan di Indonesia Pedoman Pengolahan Air Limbah Industri Pengolahan Ikan di Indonesia Bulan Maret , 2019 Kerjasama teknis co-benefits approach KLHK Indonesia dan KLH Jepang. August 2020.*
- Sulistijowati, rieny S., Suhara, otong D., Nurhajati, J., Afrianto, E., & Udin, Z. (2011). *Mekanisme Pengasapan Ikan*. 65–92.  
<http://repository.ung.ac.id/karyailmiah/show/240/mekanisme-pengasapan-ikan.html>
- Taziki, M., Ahmadzadeh, H., & A. Murry, M. (2016). Growth of *Chlorella vulgaris* in High Concentrations of Nitrate and Nitrite for Wastewater Treatment. *Current Biotechnology*, 4(4), 441–447.
- Yogafanny, E. (2015). Pengaruh Aktifitas Warga di Sempadan Sungai terhadap Kualitas Air Sungai Winongo. *Jurnal Sains & Teknologi Lingkungan*, 7(1), 29–40.



## APPLICATION OF THE INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-MASS SPECTROMETRY (ICP-MS) METHOD IN ZINK ANALYSIS

Nabilah Bilqis<sup>1)\*</sup>, Erni Sulistiawati<sup>2)</sup> dan Miftakh Nur Rahman<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Analisis Kimia, Institut Pertanian Bogor, Jl Kumpang No 14, Bogor, 16128, Indonesia;

<sup>2)</sup>Sekolah Vokasi, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kumpang No.14, Bogor, 16128, Indonesia;

<sup>3)</sup>PT Prodia Widyahusada Tbk, Jl Kramat Raya No 150, Jakarta, 10410, Indonesia.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 Dec 2020,

Revised xx xxx 2021,

Accepted xx xxx 2021

Available online xx xxx 2021

#### Keywords:

- ✓ defisiensi zink
- ✓ inductively coupled plasma-mass spectrometry (icp-ms)
- ✓ zink

\*corresponding author:

[Nabilahbilqis99@gmail.com](mailto:Nabilahbilqis99@gmail.com)

Phone: +6287770416363

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.321>

### ABSTRACT

Zinc is a nutrient that affects cell growth, helps the body's metabolism, activates T cells (T lymphocytes), cell regeneration, and repairs body tissues. Zinc in the body undergoes a process of excretion every day, therefore daily intake of zinc needs to be considered to maintain the amount of zinc in the body in a normal amount. This study aimed to obtain information on the application of the Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method to determine the concentration of zinc in the serum of pregnant women. The application of Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method in zinc analysis provided the advantages of a minimal sample volume requirement with higher instrument sensitivity, fast retention time and had a concentration detection limit of up to parts per billion (ppb). Analysis of the zinc concentration in the serum of pregnant women using the ICP-MS method showed 80% serum with a concentration below the reference value, 13.3% normal and 6.7% a concentration higher than the WHO reference value.

### ABSTRAK

#### Aplikasi Metode Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) Dalam Analisis Zink

Zink adalah salah satu jenis zat gizi yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel, mengaktifkan sel T (limfosit T), regenerasi sel, dan membantu metabolisme tubuh. Zink di dalam tubuh setiap harinya mengalami proses ekskresi oleh karena itu asupan harian zink perlu diperhatikan untuk menjaga jumlah zink di dalam tubuh tetap dalam jumlah yang normal. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi penggunaan metode Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) untuk menentukan konsentrasi zink dalam serum ibu hamil. Penggunaan metode ICP-MS dalam analisis zink memberikan keuntungan berupa kebutuhan volume sampel minimal dengan sensitivitas alat lebih tinggi, waktu retensi yang cepat serta memiliki batas limit deteksi konsentrasi hingga bagian per triliun (ppt). Analisis konsentrasi zink dalam serum ibu hamil dengan metode ICP-MS menunjukkan 80% serum dengan konsentrasi dibawah nilai rujukan, 13,3% normal dan 6,7% konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan nilai rujukan menurut WHO.

Kata kunci : defisiensi zink, inductively coupled plasma-mass spectrometry (icp-ms), zink

## PENDAHULUAN

Mineral esensial merupakan mineral yang dibutuhkan dalam proses fisiologis makhluk hidup dalam pembentukan organ atau membantu kerja enzim. Mineral esensial dalam tubuh memiliki beberapa unsur yang terbagi menjadi dua golongan, yaitu mineral mikro dan mineral makro. Mineral makro dibutuhkan oleh tubuh dalam jumlah besar seperti kalsium, kalium, natrium, fosfor dan magnesium sedangkan

mineral mikro dibutuhkan oleh tubuh dalam jumlah sedikit seperti zink, kobalt, tembaga, iodin, besi dan mangan (Arifin, 2008).

Zink adalah salah satu zat gizi yang berpengaruh terhadap pertumbuhan sel, mengaktifkan sel T (limfosit T), regenerasi sel, membantu metabolisme tubuh, dan memperbaiki jaringan tubuh. Zink di dalam tubuh setiap harinya mengalami proses ekskresi oleh karena itu asupan harian zink perlu diperhatikan untuk menjaga jumlah zink di dalam tubuh tetap dalam jumlah yang normal karena di dalam tubuh tidak



terdapat mekanisme khusus dalam penyimpanan zink (Simbolon, 2019). Kebutuhan zink meningkat pada masa kehamilan, laktasi dan anak-anak. Defisiensi zink pada ibu hamil dapat menyebabkan tidak optimalnya pertumbuhan dan fungsi imunitas janin serta terganggunya fungsi kognitif (Anggraheni, 2015). Salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan konsentrasi zink di dalam tubuh sebagai indikator defisiensi zink antara lain konsentrasi zink dalam serum darah. Konsentrasi zink di dalam serum adalah parameter yang paling sering digunakan untuk menetapkan kadar zink seseorang, karena mudah dilakukan dan hasilnya akurat (Gibson, 2005). Konsentrasi zink dalam serum dapat diukur menggunakan *Inductively coupled plasma-mass spectrometry* (ICP-MS). ICP-MS memiliki kelebihan yaitu dapat mengukur kadar multi unsur dalam waktu yang bersamaan, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit dan mempunyai batas deteksi (*limit detection*) yang rendah yaitu hingga tingkat nanogram (Rukihati & Saryati, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi penggunaan metode *Inductively coupled plasma-mass spectrometry* (ICP-MS) untuk mengukur konsentrasi zink (Zn) dalam serum darah ibu hamil.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dipergunakan yaitu Sampel Serum sebanyak 15 sampel, n- Butanol, ICP *multi-element standard solution* IV 10 ppm, Serum Control lyophilised, *ultra-pure water*, Alkohol 70%, HNO<sub>3</sub> 2%, HNO<sub>3</sub> 6%, Tabung ICP 6 mL, Triton X-100, Amonia 25%, Padatan EDTA, Standar Indium 1000 ppm, Standar Merkuri 1000 ppm, Tabung Darah bertutup biru tua, Botol Kaca, Gas argon dan Tip 200 $\mu$ L. Alat-alat yang digunakan yaitu ICP-MS (Agilent 7700X), *Fumehood*, Mikropipet 200  $\mu$ L dan 10 mL, Pipet AutoRep E, Vortex, Labu ukur 100 mL dan 1000 mL, Sudip, Neraca analitik (Ohaus PA214), Rak tabung, Sonikator, microtube vortex dan Sentrifuse.

### Metode

Pembuatan Diluen. *Ultra-pure water* sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian EDTA ditimbang sebanyak 37 miligram dan ditambahkan ke dalam labu ukur. Larutan tersebut ditambahkan Triton X-100

sebanyak 700  $\mu$ L dan Amonia 25% sebanyak 105  $\mu$ L. Larutan kemudian ditera dengan *ultra-pure water* dan dihomogenkan. Larutan disonikasi selama 1 jam. Prosedur pembuatan larutan standar merkuri 10 ppm yaitu sebanyak 1 mL larutan stok merkuri 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditera dengan diluen dan dihomogenkan. Prosedur pembuatan larutan standar indium 10 ppm yaitu sebanyak 1 mL larutan stok indium 1000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditera dengan HNO<sub>3</sub> 6% dan dihomogenkan.

Pembuatan Larutan Standar dan Kontrol Serum. Larutan Deret Standar dibuat sebanyak 8 level dengan pengenceran bertahap. Larutan Stok Standar 8 dibuat dengan dicampurkan ICP *multi element standard solution* 10 ppm sebanyak 5000  $\mu$ L, standar merkuri 10 ppm sebanyak 500  $\mu$ L dan diluen sebanyak 4500  $\mu$ L ke dalam botol kaca, kemudian larutan tersebut divortex sampai homogen. Larutan Stok Standar 7 hingga 1 dibuat secara seri dengan faktor pengenceran sebanyak 4 kali yaitu 1 mL standar ditambahkan 3 mL diluen. Pembuatan deret standar dilakukan dengan cara masing - masing standar dipipet sebanyak 100  $\mu$ L, kemudian ditambahkan 20  $\mu$ L n-butanol dan diluen sebanyak 1880  $\mu$ L. Larutan deret Standar 0 dibuat dengan dicampurkan diluen sebanyak 1980  $\mu$ L dan n-butanol sebanyak 20  $\mu$ L sedangkan blanko digunakan HNO<sub>3</sub> 2%. Larutan kontrol serum dihomogenkan dengan *microtube vortex* selama 5 menit kemudian, larutan dipipet sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung ICP kemudian ditambahkan diluen sebanyak 1800  $\mu$ L setelah itu larutan divortex. Kontrol serum dibuat dua kali ulangan. Sampel darah pasien sebanyak 15 orang yang masing - masing disimpan di dalam tabung bertutup biru tua yang berisikan EDTA bebas logam. Sampel darah kemudian disentrifuse dengan kecepatan sebesar 3000 rpm selama 15 menit. Serum yang didapatkan dipipet sebanyak 200  $\mu$ L ke dalam vial ICP, kemudian ditambahkan diluen sebanyak 1800  $\mu$ L. Larutan sampel kemudian divortex agar homogen.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan untuk penentuan zink adalah serum sebanyak 15 sampel, serum diperoleh dengan cara pemisahan dengan sentrifuse 3000 rpm selama 15 menit yang berasal dari sampel darah tanpa antikoagulan. Serum yang didapatkan dipipet sebanyak 200  $\mu$ L,

kemudian dimasukkan ke dalam vial ICP. Sampel serum darah ditambah diluen sebanyak 1800  $\mu\text{L}$  dan divortex agar homogen. Larutan diluen berisikan EDTA sebanyak 37 miligram, 700  $\mu\text{L}$  Triton X-100, 105  $\mu\text{L}$  Amonia 25% dan *ultra-pure water*. Larutan diluen tersebut berfungsi untuk menjaga protein dan lemak tetap dalam larutan sampel serta Triton X-100 yang merupakan surfaktan juga berfungsi untuk meningkatkan kelarutan protein dalam sampel (Levi *et al.*, 2018). Metode ICP-MS adalah teknik yang paling efektif untuk mengukur *trace elements* dan mineral dalam sampel biologis. Jumlah volume sampel biologis yang sedikit menjadi salah satu keterbatasan dalam analisis tetapi ICP-MS dapat mengatasi masalah tersebut. Metode ICP-MS banyak dikembangkan untuk pemeriksaan dalam bahan biologis seperti darah, plasma, urin dan rambut. Metode ICP-MS mampu mengkuantifikasi 27 hingga 32 elemen secara bersamaan dalam matriks biologis (Gouille *et al.*, 2005).

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi zink dalam serum darah

Sampel	Konsentrasi Zink ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )
1	123
2	62
3	76
4	98
5	51
6	63
7	55
8	29
9	43
10	58
11	64
12	66
13	63
14	80
15	72

Penentuan konsentrasi zink di dalam tubuh sangat diperlukan karena zink memiliki peranan esensial dalam fungsi tubuh. Konsentrasi zink di dalam serum paling sering digunakan sebagai parameter uji dalam menetapkan keadaan konsentrasi zink seseorang karena mudah dilaksanakan dan hasil yang didapatkan akurat sedangkan metode ICP-MS banyak digunakan untuk penentuan *multi element* dalam sampel serum manusia karena efisien, sensitivitas tinggi, memiliki kemampuan analisis isotop, hasil analisis yang didapatkan mencapai presisi dan akurasi yang tinggi untuk analisis isotop, serta

waktu analisis yang dibutuhkan cepat (Abduljabbar *et al.*, 2019). Hasil pengukuran konsentrasi zink dalam serum dapat dilihat pada Tabel 1.

Keuntungan pengukuran zink menggunakan ICP-MS adalah sensitivitas alat lebih tinggi dan memiliki batas limit deteksi konsentrasi hingga bagian per triliun (ppt). Selain itu, ICP-MS dapat mengukur konsentrasi logam secara *multi element* dalam analisis dengan waktu yang cepat dan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk analisis lebih sedikit dibandingkan dengan AAS (Tyler & Yvon, 2003).

Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi zink pada Tabel 1 sampel serum pasien ibu hamil memiliki konsentrasi zink berkisar antara 29 – 123  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Nilai rujukan konsentrasi zink dalam serum menurut *world health organization* (WHO) yaitu 80 - 110  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Berdasarkan nilai rujukan tersebut persentase hasil sampel yang dianalisis yaitu 80% memiliki konsentrasi lebih rendah dari nilai rujukan, 13,3% normal dan 6,7% memiliki konsentrasi lebih tinggi dari nilai rujukan. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar pasien ibu hamil tersebut mengalami defisiensi zink atau kekurangan zink. Ibu hamil sangat rentan terhadap defisiensi zink karena jumlah zink pada ibu hamil relatif mengalami penurunan sebesar 35% yang terjadi akibat adanya perubahan hormon dan pembagian nutrisi dari ibu ke janin. Konsentrasi zink yang rendah pada ibu hamil dapat menyebabkan berkurangnya nutrisi dari ibu ke janin dan berdampak pada berkurangnya penyediaan gizi yang memadai untuk janin. Fungsi zink bagi ibu hamil yaitu mendukung perkembangan dan pertumbuhan janin sampai dengan masa balita dan anak-anak. Defisiensi zink selama kehamilan dapat menyebabkan keterlambatan tumbuh kembang pada janin karena berpengaruh terhadap sistem imun (Wijaksono *et al.*, 2019). Defisiensi zink di dalam tubuh dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kurangnya asupan zink, gangguan proses penyerapan zink, konsentrasi albumin dalam plasma, meningkatnya kebutuhan zink dalam tubuh dan ekskresi zink.

## KESIMPULAN

Penggunaan metode *Inductively coupled plasma-mass spectrometry* (ICP-MS) dalam pengukuran zink memberikan keuntungan berupa kebutuhan volume sampel minimal dengan

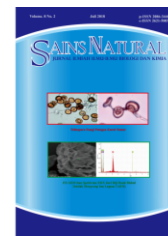
sensitivitas alat lebih tinggi, waktu pengukuran yang cepat serta memiliki batas limit deteksi konsentrasi hingga bagian per triliun (ppt). Analisis konsentrasi zink dalam serum ibu hamil dengan metode ICP-MS menunjukkan 80% sampel serum memiliki konsentrasi lebih rendah dari nilai rujukan, 13,3% normal dan 6,7% konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan nilai rujukan menurut WHO.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada staff - staff laboratorium *Mass Spectrometry* PT Prodia Widyahusada Tbk dalam membimbing, memfasilitasi dan mendukung penulis dalam menyelesaikan studi ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- [WHO]. *World Health Organization*. (1996). *Zinc: Trace Element In Human Nutrition And Health*. Geneva : WHO
- Abduljabbar, T., Sharp, B., Reid, H., Befroeid, N., Peto, T. dan Lengyel, I. (2019). Determination of Zn, Cu and Fe in Human Patients Serum using Micro-Sampling ICP-MS and Sample Dilution. *Talanta* 204, 663-669
- Anggraheni, N. (2015). Gambaran Kadar Serum Seng dan Z-Score TB/U pada Anak Usia 9-12 Tahun. (Skripsi). Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia
- Arifin, Z. (2008). Beberapa Unsur Mineral Esensial Mikro Dalam Sistem Biologi Dan Metode Analisisnya. *Jurnal Litbang Pertanian*. 27(3), 99-105
- Gibson, R. (2005). *Principles Of Nutritional Assessment*. New York(US), Oxford University Press
- Gouille, J., Mahieu, L., Casterment, J., Neveu, N., Bonneau, L., Laine, G., Bouige, D., dan Lacroix, C. (2005). Metal And Metalloid Multi-Elementary ICP-MS In Whole Blood, Plasma, Urine And Hair. *Forensic science international*. 153, 39-44
- Levi, M., Hjelm, C., Harari, F., dan Vahter, M. (2018). ICP-MS Measurement of Toxic and Essential Elements in Human Breast Milk. A Comparison of Alkali Dilution and Acid Digestion Sample Preparation Methods. *Clinical Biochemistry*. 53, 81-87
- Rukihati & Saryati. (2006). Analisis Cuplikan Lingkungan dan Bahan Geologi Dengan Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 8(1), 92-97
- Simbolon, D. (2019). *Intervensi Gizi Spesifik Pencegahan Stunting (Panjang Badan Pendek) Pada Ibu Menyusui Dan Anak Usia 0-24 Bulan*. Surabaya, Indonesia: Media Sahabat Cendekia
- Tyler, G. dan Yvon, J. (2003). ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared. *Horiba*, 1-11
- Wijaksono, A., Rasyid, R., dan Mariko, R. (2019). Hubungan Kadar Zink dan Kenaikan Berat Badan Ibu Hamil dengan Berat Badan Bayi Lahir di RSUD Curup Kabupaten Rejang Lebong Propinsi Bengkulu. *Majalah Kedokteran Andalas*. 42(2), 56-61



## ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA OF CLOVE LEAF (*Syzygium aromaticum* L) AND MECHANISM OF ACTION ANTIBACTERIAL

Sogandi<sup>1)</sup>, Irviyani<sup>1)</sup> dan Usep Suhendar<sup>2)\*</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jl. Sunter Permai Raya, DKI Jakarta, 14350, Indonesia ;

<sup>2)</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Jl Pakuan No 1, Kota Bogor, 16129, Indonesia;

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 Jul 2021,

Revised 18 Jan 2022,

Accepted 25 Jan 2022

Available online 28 Jan 2022

#### Keywords:

- ✓ Antibacterial
- ✓ Endophytic
- ✓ Clove Leaves
- ✓ Bioactive
- ✓ *Syzygium aromaticum*

#### \*corresponding author:

[usep.suhendar@unpak.ac.id](mailto:usep.suhendar@unpak.ac.id)

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.326>

### ABSTRACT

*Endophytic bacteria are microorganisms that live in plant parts. Endophytic bacteria from clove (*Syzygium aromaticum* L.) leaves with antibacterial activity are rarely reported. Therefore, this study aims to isolate endophytic bacteria from clove leaves (*Syzygium aromaticum* L.), screen and determine potential endophytic bacteria as antibacterial compounds, identify molecularly with 16S rRNA, analyze bacterial growth curves and detect bioactive compounds produced by potential bacteria. Endophytic bacteria were isolated as many as 7 pure isolates including IRV1, IRV2, IRV3, IRV4, IRV5, IRV6, IRV7. IRV3 isolates showed the most dominant activity in inhibiting the growth of test bacteria and as the most potential producer of antibacterial compounds. Molecular identification with PCR (polymerase chain reaction) amplification in the 16S rRNA gene showed IRV3 isolate as *Staphylococcus* sp. with a 99% similarity value. Besides, the results of GCMS analysis of secondary metabolites of IRV3 isolates showed pyrazine content as a dominant compound, which has been known as a bioactive compound in inhibiting bacterial growth. Therefore, the results of this study revealed that IRV3 isolates that were successfully isolated and identified would be able to contribute to further research to find new antibiotic sources.*

### ABSTRAK

#### Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) dan Mekanisme Aksinya Sebagai Antibakteri

Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang hidup di dalam bagian tanaman. Bakteri endofit dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dengan aktivitas antibakteri masih jarang dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.), skrining dan menentukan bakteri endofit potensial sebagai penghasil senyawa antibakteri, mengidentifikasi secara molekuler dengan 16S rRNA, menganalisis kurva pertumbuhan bakteri dan mendeteksi senyawa bioaktif yang diproduksi oleh bakteri potensial. Bakteri endofit yang berhasil diisolasi sebanyak 7 isolat murni diantaranya IRV1, IRV2, IRV3, IRV4, IRV5, IRV6, IRV7. Isolat IRV3 menunjukkan aktivitas yang paling dominan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji dan sebagai penghasil senyawa antibakteri yang paling potensial. Identifikasi molekuler dengan amplifikasi PCR (*polymerase chain reaction*) pada gen 16S rRNA menunjukkan isolat IRV3 sebagai *Staphylococcus* sp. dengan nilai similaritas 99%. Selain itu, hasil analisis GCMS dari metabolit sekunder isolat IRV3 menunjukkan kandungan pirazin sebagai senyawa dominan, yang telah dikenal sebagai senyawa bioaktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, hasil penelitian ini mengungkapkan bahwa isolate IRV3 yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi akan dapat berkontribusi pada penelitian lebih lanjut untuk menemukan sumber antibiotik baru.

Kata kunci: antibakteri, endofit, daun cengkeh, bioaktif, *Syzygium aromaticum*



## PENDAHULUAN

Sumber daya alam Indonesia memiliki beragam tanaman yang dapat digunakan sebagai sumber untuk pengobatan. Sumber daya alam telah menyediakan industri farmasi dengan sumber senyawa kimia yang paling penting, dan hingga 40% dari obat modern berasal dari sumber alam (Jassim & Naji, 2003). Ini menunjukkan peran terapeutik potensial tanaman di bidang kesehatan (health) (Barthwal *et al.*, 2008). Tanaman memiliki aktivitas antioksidan yang mengandung senyawa metabolit sekunder (Asif, 2015). Senyawa kimia yang digunakan sebagai antioksidan alami seperti copherol, asam askorbat, dan flavonoid telah banyak dipelajari (Birch *et al.*, 2001). Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) merupakan tanaman yang telah banyak digunakan oleh masyarakat di Indonesia. Cengkeh memiliki kandungan minyak sebagai hasil produk olahan dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L). Produk olahan dari tanaman cengkeh memiliki senyawa eugenol. Karakterisasi dilakukan dengan metode GC-MS terhadap senyawa aktif yang terdapat pada produk olahan utama minyak cengkeh tersebut, menyimpulkan bahwa senyawa penting yang diperoleh dari produk olahan tanaman cengkeh memiliki kesamaan dengan senyawa eugenol dengan tingkat kesamaan sebesar 98%. Senyawa kimia tersebut memiliki aktivitas sebagai anti-mikrobia.

Bakteri endofit mampu hidup bersama secara simbiosis dalam jaringan tanpa menyebabkan efek negatif bagi tanaman. Hubungan antara tanaman dan bakteri endofit merupakan simbiosis mutualisme yaitu menghasilkan senyawa bioaktif yang sama pada tanaman inangnya (Barbara & christine, 2006). Mikroorganisme endofit merupakan mikroorganisme yang dapat diisolasi dari seluruh bagian tanaman (Larran *et al.*, 2016). Tanaman dapat bersimbiosis dengan mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa kimia yang mirip dengan senyawa kimia yang dihasilkan oleh tanaman inangnya. Kemampuan mikroba endofit untuk menghasilkan senyawa kimia sesuai dengan tanaman inangnya menjadi peluang besar yang dapat digunakan untuk pencarian dan sekaligus memproduksi senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai obat yang diperoleh dari produksi mikroba endofit. Jadi, jika endofit yang diperoleh dari tanaman dapat menghasilkan senyawa kimia

dalam jumlah yang besar dan tidak perlu mengurangi tanaman inangnya untuk diambil sebagai bahan simplisia. Dengan mengolahnya menjadi simplisia tentu mungkin membutuhkan waktu yang lama dalam setiap proses pemisahan senyawa kimia (Radji, 2005).

Berdasarkan sifat bakteri endofit, bakteri endofit melawan mikroba patogen dengan mengganggu metabolisme sel, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu permeabilitas, dan menghambat sintesis protein dalam sel (Syarmalina, 2008). Bakteri endofit ini ditemukan di berbagai bagian jaringan tanaman, tetapi tidak menyebabkan penyakit. Bakteri endofit ini mampu hidup saling tidak merugikan, dalam hal ini bakteri endofit memperoleh nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan melindungi tanaman dari berbagai kondisi biotik dan abiotik. Sebaliknya, tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif selama hidup bersimbiosis tersebut (Tanaka *et al.*, 1999). Berdasarkan latar belakang ini, penelitian dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit molekuler dari daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L), memperlambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L), *Tryptone Soy Agar* (TSA) Merk, *Tryptic Soy Broth* (TSB) Merk, NaClO<sub>3</sub>, Buffer Posfat, etanol 70%, pelarut n-butanol, n-heksana, etil asetat, Ampicillin 10 mg/ml, nystatin, aqua dest, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739. Alat yang digunakan dalam penelitian ini termasuk *Laminar Air Flow* (LAF), sentrifugal, UV-VIS Spectrophotometer, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Gas Chromatography-Mass Spectrometer* (GC-MS) *Agilent Technologies* 7890, perangkat lunak ChromasPro, DNA MAN v9.0, MEGA 7.0.

### Metode

#### Isolasi Bakteri Endofit Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L)

Dalam penelitian ini, daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dengan kondisi

karakteristik baik dan dari tengah batang permukaan disterilkan mengikuti protokol Sogandi *et al.*, (2019) dengan modifikasi. Pertama, daun segar dicuci dengan air mengalir, kemudian permukaan disterilkan dengan 2% natrium hipoklorit selama 5 menit dan dicuci dengan air suling setidaknya tiga kali. Sampel daun cengkeh akhirnya dicuci dengan etanol 70% dan kemudian diuapkan. Setelah penguapan etanol dari permukaan daun cengkeh, daun cengkeh dipotong menjadi potongan-potongan kecil (1x1 cm) dan ditempatkan pada permukaan piring *Tryptone Soy Agar* (TSA) yang dilengkapi dengan nystatin *incrusted* pada suhu 37 ° C. Piring diperiksa setiap hari setelah injeksi, dan setelah tiga hari inkubasi, bakteri endofit dari sampel daun cengkeh diambil tujuh koloni dengan morfologi terbaik, dimurnikan dengan isolat budaya untuk memastikan bahwa itu benar-benar koloni tunggal, isolat bernomor adalah Irv1, Irv2, Irv3, Irv4, Irv5, Irv6, dan Irv7, ditransfer secara terpisah ke TSA miring sebagai media stok dan disimpan pada 4°C untuk penggunaan lebih lanjut.

#### **Persiapan Kultur Bakteri**

Sepuluh mikroliter dari isolat yang diperoleh ditransfer ke tabung reaksi yang berisi 50 mL media TSB. Isolat ditumbuhkan pada media tersebut selama 24 jam pada suhu 37<sup>o</sup> C. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi untuk memperoleh supernatant dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh, disimpan pada suhu -20°C dan diukur aktivitas antibakterinya.

#### **Aktivitas Bakteri Endofit Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli***

Pengujian aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 dilakukan dengan metode paper disk pada media *Tryptone Soy Agar* (TSA). Lima kertas cakram disiapkan yaitu masing-masing tiga kertas cakram untuk bakteri endofit daun cengkeh dan dua kertas cakram untuk kontrol positif dan kontrol negatif. Selanjutnya diuji bakteri endofit potensial menggunakan metode fraksinasi dengan pelarut n-butanol, n-heksana, dan etil asetat.

#### **Optimasi Kurva Pertumbuhan**

Isolat potensial ditumbuhkan dalam medium TSB 5 mL kemudian diinkubasi selama 12 jam. Isolat potensial ditumbuhkan pada media TSB sebanyak 50 mL, diambil 1% kemudian dikultur isolat potensial tersebut pada suhu 37<sup>o</sup>C selama 24 jam dilakukan proses inkubasi, setiap dua jam kultur isolat diambil dan disimpan pada suhu -20<sup>o</sup>C. Kultur hasil isolasi selanjutnya dilakukan penentuan nilai serapannya pada panjang gelombang 600 nm kemudian dibuat kurva pertumbuhannya.

#### **Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Supernatan Bakteri endofit potensial daun dilakukan pengenceran terlebih dahulu dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Kemampuan supernatan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 ditentukan berdasarkan zona hambat.

#### **Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dengan Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GCMS)**

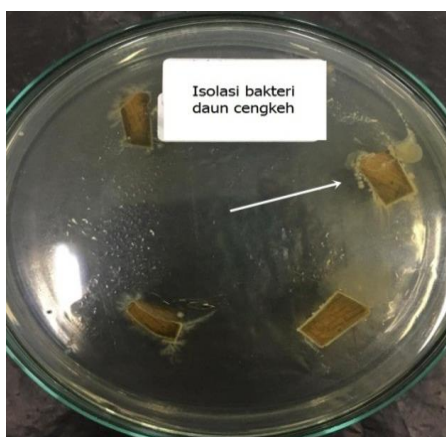
Analisis kimia dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas ditambah dengan GCMS *Agilent Technologies* 7890 dilengkapi dengan HP ultra 2 Capillary Column (30m×0.20 mmLD, 0.11µm filmthickness). Temperatur kolom, 250<sup>o</sup>C, kecepatan linear gas helium gas pembawa, 30cm/detik, rasio split, 1/30, temperatur sumber ion, 230<sup>o</sup>C, dan temperatur antarmuka 280<sup>o</sup>C. Identifikasi senyawa kimia dibandingkan dengan *database* dan dikonfirmasi menggunakan sampel standar otentik (Suhendar & Sogandi, 2019).

#### **Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) (Suhendar *et al.*, 2021)**

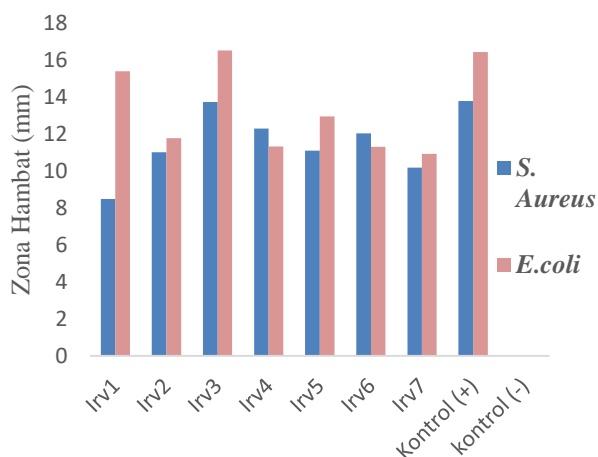
Dari total tujuh isolat, isolat potensial selanjutnya dilakukan isolasi genom. Selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan gen 16S rRNA menggunakan mesin PCR. Hasil PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarose dan dilakukan visualisasi dibawah sinar UV dan diperoleh pita DNA, berikutnya dilakukan pemurnian. Selanjutnya dilakukan pensejajaran dengan urutan basa dalam database NCBI. Hasil pensejajaran selanjutnya dimasukkan ke dalam NJPlot untuk dilakukan konstruksi pohon filogenetik.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuh isolat murni (Irv1, Irv2, Irv3, Irv4, Irv5, Irv6, Irv7) diperoleh dari bakteri endofit daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L). Pertama pengujian dilakukan dari tujuh isolat murni, yaitu pengujian aktivitas antibakteri dari isolat bakteri daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) terhadap bakteri *staphylococcus aureus* di 6538 *Escherichia coli* ATCC 8739. Uji aktivitas bakteri endofit daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 dilakukan dengan metode *paper disk* dengan menggunakan media TSA. Pada pengujian menggunakan lima kertas cakram pada setiap bakteri yang diuji. Tiga cakram untuk sampel bakteri endofit daun cengkeh dan dua cakram untuk kontrol positif dan kontrol negatif.



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri endofit daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L)



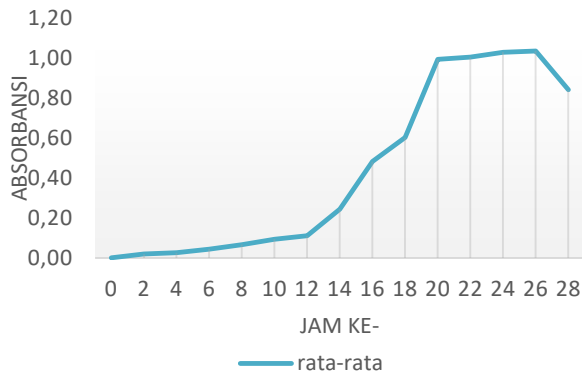
Gambar 2. Diagram Hasil Uji Aktivitas Bakteri Endofit daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L)

Hasil tes bakteri endofit potensial daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L), kontrol negatif dalam pelarut dan kontrol positif dalam bentuk ampisilin 10 mg / ml menunjukkan bahwa bakteri endofit Irv3 memiliki penghambatan yang lebih signifikan daripada isolat lainnya. Oleh karena itu sampel Irv3 disebut sebagai bakteri endofit potensial. Tes awal bakteri endofit potensial Irv3 dilakukan dengan menggunakan metode fraksinasi dengan pelarut n-butanol, n-heksana dan etil asetat.

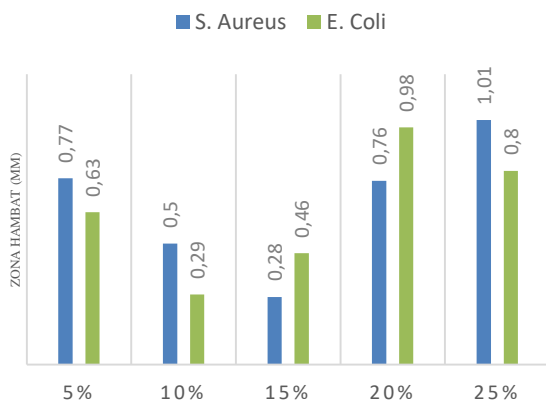
Tabel 1. Hasil uji aktivitas terhadap bakteri endofit Irv3

Bakteri Potensial	Diameter rata-rata (mm)
Kontrol (-)	0
kontrol (+)	16,42 ± 0,03
n-butanol	11,88 ± 0,52
n-heksan	17,16 ± 0,97
etil asetat	20,65 ± 2,49

Hasil aktivitas uji bakteri endofit potensial daun cengkeh Irv3 dengan kelompok uji fraksi n-butanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat menunjukkan angka daya penghambatan terbaik adalah fraksi etil asetat dengan luas rata-rata zona hambatan di kedua bakteri uji adalah 20,65 ± 2,49. Berdasarkan hasil kurva yang terbentuk pada gambar 3, dapat diketahui bahwa potensi bakteri endofit Irv3 mengalami fase lag atau fase adaptasi pada jam ke-0 hingga ke-12; hal ini dapat dilihat dari peningkatan absorbansi yang tidak terlalu tinggi. Pada fase ini bakteri melakukan penyesuaian terhadap media tumbuh bakteri. Pada fase ini bakteri mampu atau tidak mampu untuk bertahan hidup pada media tersebut. Setelah mengalami fase lag, bakteri potensial mengalami fase eksponensial yang dapat dilihat dengan peningkatan nilai absorbansi pada jam ke-14 hingga ke-20. Pada fase ini, tentu bakteri yang mampu bertahan hidup pada media tumbuh akan tumbuh dengan cepat. Pertumbuhan bakteri tersebut antara bakteri, memiliki pertumbuhan yang berbeda-beda, hal ini dipengaruhi oleh faktor sifat genetik dari bakteri tersebut. Setelah itu, bakteri potensial menjalani fase stasioner yang dapat dilihat pada nilai absorbansi pada jam ke-20 hingga ke-26. Pada fase ini, bakteri menuju laju kematiannya. Kondisi ini menunjukkan keseimbangan keseluruhan bakteri dengan kondisi media dan adanya pembelahan sel yang berkurang.



Gambar 3. Hasil optimasi kurva pertumbuhan

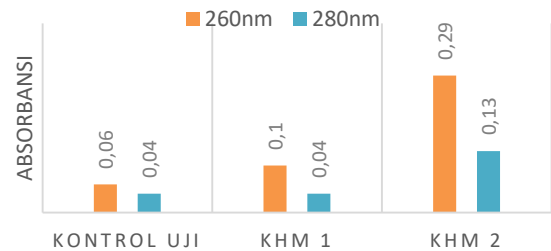
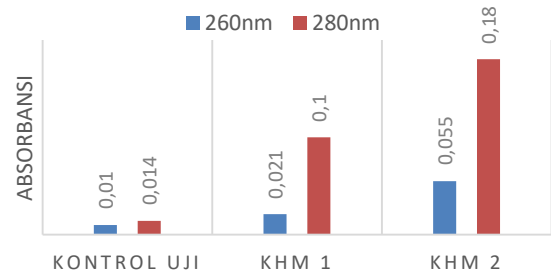


Gambar 4. Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum

Bakteri endofit potensial Irv3 pada fraksi etil asetat dianggap 100% dilakukan pengenceran terlebih dahulu dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Hasil tes aktivitas antibakteri dari lima konsentrasi ini menunjukkan bahwa setiap konsentrasi menghasilkan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dengan rata-rata  $0,77 \pm 0$  mm;  $0,50 \pm 0,002$  mm;  $0,28 \pm 0,002$  mm;  $0,76 \pm 0,01$  mm dan  $1,01 \pm 0$  mm. Sedangkan zona *resistance* terhadap *Escherichia coli* dengan rata-rata  $0,63 \pm 0$  mm;  $0,29 \pm 0$  mm;  $0,46 \pm 0,01$  mm;  $0,98 \pm 0,002$  mm; dan  $0,80 \pm 0,001$  mm. Hasil pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kemudian dihitung untuk menunjukkan bahwa konsentrasi terendah yang menghasilkan zona hambar adalah 15% pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada bakteri *Escherichia coli*, konsentrasi terendah adalah 10%. Hasil kedua konsentrasi tersebut ditandai dengan tidak adanya keruhan sebelum inkubasi dan sesudah inkubasi.

Gambar 5 dan 6 menunjukkan terjadinya peningkatan absorbansi dari supernatan sel, yang menandakan terjadinya peningkatan bahan-bahan yang dapat diserap pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang di dikeluarkan oleh sel bakteri.

Pada pengujian ini terlihat adanya kebocoran sel yang diamati pada panjang gelombang 260 nm untuk protein dan panjang gelombang 280 nm untuk asam nukleat. Kebocoran sel dapat diakibatkan adanya senyawa aktif yang dihasilkan oleh bakteri endofit. Dengan adanya senyawa kimia tersebut dapat mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga komponen didalam sel terganggu dan mengakibatkan komponen sel keluar.

Gambar 5. Kebocoran Sel Protein dan Asam Nukleat daun cengkeh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.Gambar 6. Kebocoran Sel Protein dan Asam Nukleat daun cengkeh terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739.

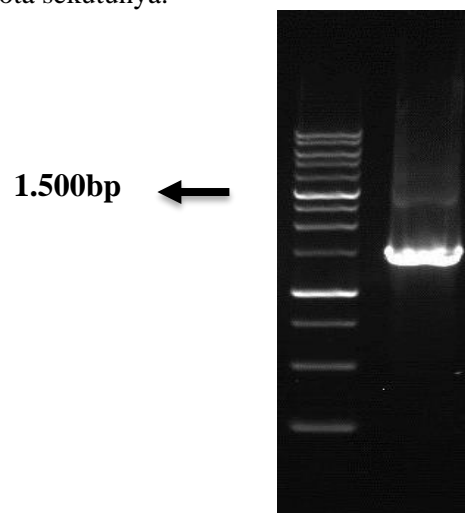
*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 memiliki kebocoran sel paling banyak daripada *Escherichia coli* ATCC 8739. Konsentrasi bakteri potensial dari fraksi daun cengkeh etil asetat Irv3 mempengaruhi kebocoran asam nukleat dan protein dalam sel bakteri, yaitu pada konsentrasi 2 MIC, ada kebocoran asam nukleat daripada pada konsentrasi 1 MIC. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 paling sensitif terhadap bakteri endofitik potensial Irv3 etil asetat daun cengkeh (Nilai MIC 15%) dibandingkan dengan *Escherichia coli* ATCC 8739 (nilai MIC 10%). Perbedaan antara keduanya adalah karena perbedaan dalam struktur dinding sel, dimana bakteri Gram-positif memiliki lapisan *lipopolysaccharide* tipis dan lapisan peptidoglikan tebal. Bakteri gram negatif

memiliki lapisan *lipopolysaccharide* tebal dan lapisan peptidoglikan tipis.

Senyawa yang diidentifikasi ini tidak semuanya termasuk dalam kelompok senyawa dengan aktivitas antibakteri. Senyawa dengan konsentrasi tertinggi adalah *benzylhexahydropyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione*, dengan kandungan 13,47% pada waktu retensi 31.330. Senyawa dominan yang paling sering terdeteksi dalam analisis GCMS ini adalah Pyrazine dan turunannya terdeteksi pada waktu retensi 28.841 (2,52%), 29.027 (5,04%), 29.206 (11,73%), dan 31.303 (12,58%). Piran adalah senyawa dengan komponen heterosiklik yang mengandung nitrogen dan hasil dari interaksi antara dikarbonil, sedangkan amina adalah interaksi antara kelompok asam amino. Peran rantai asam amino dalam membentuk pyrazine sangat penting, terutama bagian dari rantai yang mengandung atom nitrogen seperti glutamin, asparagon, dan lysine (Yulia & Wijaya, 2015). Pyrazine termasuk dalam senyawa alkaloid karena memiliki atom nitrogen. Senyawa alkaloid dalam isolat Irv3 dianggap memiliki aktivitas antibakteri.

Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ( $A_{260}/A_{280}$ ), di mana kemurnian DNA yang diperoleh dari studi isolat Irv3 adalah 1,85 yang menurut Sambrook et al. (1989), hasil isolasi DNA dikatakan murni jika nilai rasio  $A_{260}/A_{280}$  adalah antara 1,8-2,00. Dalam penelitian ini, konsentrasi DNA yang diekstraksi adalah 283,1 ng / ul. Setelah pemurnian, urutan gen rRNA 16S ditentukan. Urutan parsial rRNA 16S yang diperoleh selaras dengan urutan basis dalam database NCBI. Urutan isolat Irv3 yang selaras menunjukkan bahwa gen rRNA 16s dalam isolat  $\pm 1500$  bp (pasangan basa). Selanjutnya, urutan gen rRNA 16s dari isolat Irv3 terdaftar ke database NCBI Genbank sebagai *Staphylococcus epidermidis*. Rekonstruksi pohon filogenetik mendukung mencari tahu hubungan antara

spesies (Zhang et al., 2019). Penyelarasan urutan bakteri dengan beberapa urutan bakteri lain yang diambil dari database NCBI GenBank dilakukan dengan menggunakan cluster X2. Selain itu, hasil penyelarasan dimasukkan ke dalam NJPlot untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat Irv3 memiliki hubungan terdekat dengan *Staphylococcus epidermidis* yang mengidentifikasi kesamaan 100%. Cladogram menghasilkan urutan 16s rRNA dari isolat potensial Irv3 dan nota sekutunya.



Gambar 8. Hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S-rRNA

Hasil elektroforesis sampel diketahui memiliki pita yang disajikan dan sejajar dengan penanda sekitar 1.500 bp. Hal ini menunjukkan bahwa fragmen gen terlibat dengan ukuran  $\pm 1.500$  bp, sehingga disimpulkan bahwa proses penguatan isolat Irv3 berhasil dilakukan. Kemudian isolat Irv3 ditentukan menggunakan urutan 16S-rRNA yang dianalisis secara penuh pada analisis Cluster Malaysia basis 1<sup>st</sup> pada urutan dilakukan dengan program BLAST-IN dari NBI.

Tabel 1. Hasil GCMS Isolat Bakteri Endofit Potensial (Irv3)

Jenis/Kode Sampel	RT	Senyawa	Kandungan (%)
Isolated Irv3	28.841	Pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione hexahydro-3-( 2-methyl propyl)-	2,52
	29.027	ISOBUTYLHEXAHYDROPYRROLO [1,2-A] PYRAZINE-1,4-DIONE	5,04
	29.206	Pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione hexahydro-3-( 2-methylpropyl)-	11,73
	31.303	Pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione hexahydro-3-( phenylmethyl)-	12,58
	31.330	BENZYLHEXAHYDROPYRROLO [1,2-A] PYRAZINE-1,4-dione	13,47

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA

Nama Sample	Panjang Gelombang (A)		Konsentrasi (ng/ul)
	260/280	260/230	
Irv 3	1.85	2.27	283.1

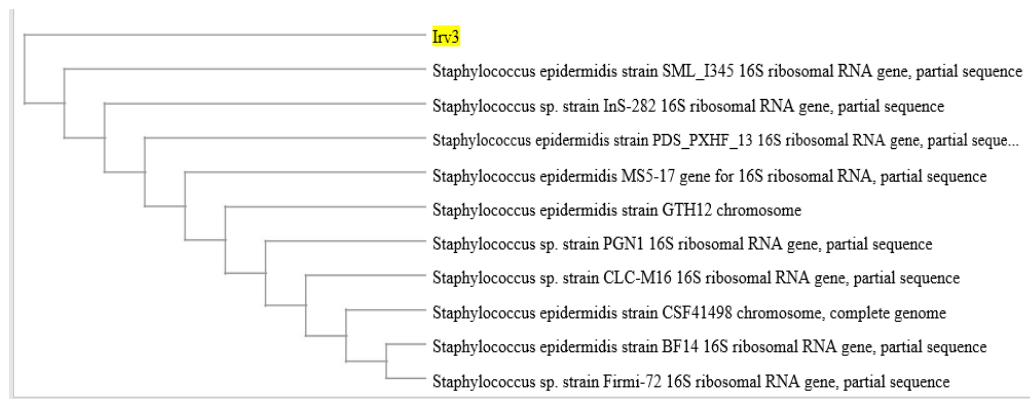
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus sp. strain Firmi-72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MH683161.1
Staphylococcus epidermidis strain BF14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MG719590.1
Staphylococcus epidermidis strain CSF41498 chromosome, complete genome	2482	14849	100%	0.0	99%	CP030246.1
Staphylococcus sp. strain CLC-M16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MH518238.1
Staphylococcus sp. strain PGN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MH412675.1
Staphylococcus epidermidis strain GTH12 chromosome	2482	10076	100%	0.0	99%	CP028282.1
Staphylococcus epidermidis MS5-17 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	LC378382.1
Staphylococcus epidermidis strain PDS_PXHF_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	KY980703.1
Staphylococcus sp. strain InS-282 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	KY964236.1
Staphylococcus epidermidis strain SML_I345 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MG937601.1
Staphylococcus epidermidis strain UTI03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2482	2482	100%	0.0	99%	MG911002.1
Staphylococcus epidermidis strain FDAARGOS_153 chromosome, complete genome	2482	14838	100%	0.0	99%	CP014119.1
Staphylococcus epidermidis strain DAR1907 chromosome, complete genome	2482	14858	100%	0.0	99%	CP013943.1

Gambar 9. Hasil Analisis BLAST dari Isolat Irv3



Gambar 10. Phylogenetic tree dari Isolat Irv3

Hasil analisa dengan menggunakan program BLAST menunjukkan bahwa bakteri endofit potensial isolat Irv3 merupakan bakteri dengan spesies *Staphylococcus sp.* dengan *identity* 99% terhadap strain Firmi-72. Filogenetik adalah metode yang digunakan dalam sistematika untuk menunjukkan keanekaragaman suatu organisme dengan melalui proses penataan ulang hubungan kekerabatan. Pohon filogenetik merupakan suatu grafik yang ditampilkan yang mampu memberikan gambaran kekerabatan yang terdiri dari sejumlah titik-titik dan beberapa cabang dengan hanya satu cabang yang menghubungkan dua titik terdekat. Setiap titik merupakan wakil unit suatu taksonomi dan setiap cabang merupakan wakil yang memiliki hubungan antar unit dengan memberikan gambaran hubungan turun temurun terhadap nenek moyang.

Hasil analisis pohon *filogenetik* isolat Irv3 menunjukkan kekerabatan yang lebih dekat dengan spesies bakteri *Staphylococcus sp.*, sehingga isolat Irv3 diidentifikasi menggunakan rRNA 16s. *Staphylococcus* adalah bakteri Gram-positif dengan diameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  dan ditandai oleh lokus individu, yang membagi lebih dari satu bidang menjadi kelompok-kelompok. *Staphylococcus* adalah anaerobik fakultatif non-motil, tidak membentuk spora yang tumbuh dengan respirasi aerobik atau fermentasi. Sebagian besar spesies memiliki kebutuhan nutrisi yang relatif kompleks, tetapi, secara umum, mereka membutuhkan sumber nitrogen organik, dipasok oleh 5 hingga 12 asam amino esensial, misalnya arginin, valin, dan vitamin B, termasuk tiamin dan nikotinamida (Khianngam *et al.*, 2013). Selain metabolit sekunder yang aktif secara biologis, bakteri endofit juga menghasilkan

antimikroba penting. Dalam sebuah penelitian yang mencari enzim endofit berproduksi tinggi di bakau di Thailand, Khianngam *et al.* (2013) menemukan bahwa bakteri Gram-positif menunjukkan lebih banyak aktivitas hidrolitik daripada bakteri Gram-negatif. Tanpa diduga, strain spesifik *S. epidermidis* diamati untuk menghasilkan analog nukleobase dengan kapasitas untuk menghambat sintesis DNA. Ketika diberikan secara intravena atau diterapkan pada tikus, molekul ini atau strain *S. epidermidis* yang hidup itu sendiri menekan pertumbuhan tumor *in vivo* (Nakatsuji *et al.*, 2018). Selanjutnya, Nawangsih *et al.*, (2011) melaporkan bahwa bakteri endofit *S. epidermidis* adalah pengendali biologis bakteri patogen lain (*Ralstonia solanacearum*) dalam tomat.

## KESIMPULAN

Kesimpulan pada penelitian ini adalah terdapat tujuh isolat murni bakteri endofit daun cengkeh yang diperoleh dari fraksi etil asetat daun cengkeh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (15%) dengan zona hambat pertumbuhan bakteri sebesar  $0.28 \pm 0,002$  mm dan bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739 (10%) dengan zona hambat  $0.29 \pm 0$  mm. Optimasi Kurva pertumbuhan bakteri potensial Irv3 mengalami tiga fase yaitu fase lag atau fase adaptasi, fase eksponensial dan fase stasioner. Pada jam ke-18 bakteri potensial Irv3 memproduksi metabolit sekunder. Isolat Irv3 mengandung senyawa pyrazine yang dapat digunakan sebagai sumber bahan alam untuk kesehatan dan teridentifikasi sebagai bakteri *Staphylococcus sp.*

## SARAN

Adapun saran dari penelitian ini adalah isolat potensial Irv3 dapat dilakukan pengujian berbagai bioaktivitas lainnya serta dilakukan isolasi senyawa kimia dari isolat potensial Irv3.

## UCAPAN TERIMA KASIH

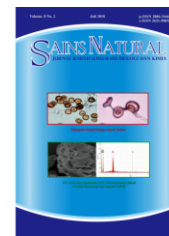
Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945, Jakarta, Indonesia, yang telah menyediakan

fasilitas yang diperlukan untuk melaksanakan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asif, M. (2015). Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *International Scientific Organization. Journal*, 1(1), 35-52.
- Barbara, J. E. S., & Christine, J. C. B. (2006). What are endophytes International Microbial Root Endophytes? (Thomas N. Sieber). *Springer-Verlag*, Berlin.
- Barthwal, J., Nair, S., & Kakkar, P. (2008). Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites. *Biomedical Environmental Science*, 21, 319-324.
- Birch, A. E., Fenner, G. P., Watkins, R., & Boyd, L. C. (2001). Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, 4502-4507.
- Candrawati, M.K. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) terhadap Kualitas Sperma Mencit (*Mus musculus* L) yang Di Induksi Streptozotocin (Skripsi). Universitas Negeri Malang.
- Jassim, SA & Naji, MA. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*. 95(3), 412-27. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x. PMID: 12911688.
- Khianngam, S., Yupa, P., Taweesak, T., Somboon, T. (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 (04), 090-096.
- Larran, S., Simon, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. P. S., & Perello, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, 92,17-23.
- Nawangsih AA, Damayanti I, Wiyono S, Kartika J.G. (2011). Selection and Characterization

- of endophytic bacteria as biological control agents of tomato bacteria wilt disease. *Hayati*, 18(1),66–70. DOI: <http://dx.doi.org/10.4308/hjb.18.2.66>.
- Radji, M. (2005). *Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal*. 113-126.
- Sogandi, & Nilasari, P. (2019). Isolation and molecular identification of Endophytic bacteria from Noni fruits (*Morinda citrifolia* l.) and their antibacterial activity. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*, 299, 012020.
- Sogandi, S., Mustofa, A. Z., Artika, I. M., & Bugi, R. B. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus Plantarum* U10 isolated from tempoyak (fermented durian) made in Indonesia against *Salmonella typhi*. *Microbiology Indonesia*, 9(2), 73-81. doi:10.5454/mi.9.2.4.
- Sogandi., Mustofa, A. Z., & I Made, A. (2019). The characterisation of bacteriocins produced by *Lactobacillus Plantarum* strains isolated from traditional fermented foods in Indonesia and the detection of its plantaricinen coding genes. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 24(1),1-7. Diperoleh dari doi: 10.22146/ijbiotech.42582.
- Stanbury, P., Whitaker, A., & Hall, S. (2016). *Principles of fermentation technology*. Third Edition. Butterworth Heinemann, Oxford.
- Suhendar, U., Siti, M., Sogandi. (2021). Identification Of Molecular Bacterial Isolate Endofit Bacteria Kasturi Mango (*Mangifera Casturi* Kosterm) Leaves And Analysis Of Antibacterial Activity (In Indonesian). *Sains Natural: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Biologi dan Kimia*. 11(1).
- Suhendar, U, & Sogandi, S. (2019). Identification of bioactive compounds in clove leaves (*Syzygium aromaticum*) extract inhibits streptococcus mutants (In Indonesian). *Al-kauniyah: Jurnal Biologi*, 12(2), 229-239. doi:10.15408/kauniyahv12i2.12251.
- Syarmalina. (2008). *Endofit dan Pelestarian Alam*. PT. ISFI Medisina.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Ku-mar. (2011). MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28(10), 2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tanaka M, Sukiman H,Takebayashi M, Saito K, SutoM, Prana MS, dan Tomita F. (1999). Isolation, Screening and Phylogenetic Identification of Endophytes from Plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment* 14(4), 237–241.
- Wang, P., Kong, F., Wei, J., Wang, Y., Wang, W., Hong, K., & Zhu, W. (2014). Alkaloids from the mangrove-derived actinomycetes *Jishengella* endophytic 161111. *MarineDrugs*, 12(1), 477-490. doi:10.3390/md12010477.5.2198-2208.2002.
- Yulia, R., & Wijaya, I. S. (2015). Antioxidant compounds of methanolic extract of soybean (*Glycine max* (L) Merrill)detam one variety from ultrasound extraction method(In Indonesian).*Jurnal Sains Farmasi & Klinis*,2(1), 1-10. doi: 10.29208/jsfk.2015.2.1.57.
- Zhang, Y., Yuan, Y., Pang, Y., Yu, F., Yuan, C., Wang, D., Hu, X. (2019). Phylogenetic reconstruction and divergence time estimation of blue dc. (Asteraceae: inuleae) in China based on nrDNA ITS and cpDNA trnL-F sequences. *Plants*, 8(210), 1-19. doi:10.3390/plants8070210.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, B. N., Feng, Z., Kuczarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterisation of endophytic colonising bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198-2208. doi:10.1128/aem.68.5.2198-2208.2002.



## UTILIZATION OF BINAHONG (*Anredera cordifolia*) LEAVES EXTRACT FROM BOGOR REGENCY AS FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

Novi Fajar Utami, Usep Suhendar\* dan Anisa Hidayatul Amini  
Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Pakuan, Bogor, Indonesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 Jul 2021,  
Revised 18 Jan 2021,  
Accepted 28 Jan 2022,  
Available online 29 Jan 2022

#### Keywords:

- ✓ Binahong
- ✓ Response surface methodology
- ✓ Yield
- ✓ free radical scavenging activity

#### \*corresponding author:

[usep.suhendar@unpak.ac.id](mailto:usep.suhendar@unpak.ac.id)  
Phone: +6281311784664

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i1.327>

### ABSTRACT

*Binahong leaves contain flavonoid and polyphenol compounds that are potentially free radical scavengers. Extraction using ultrasonic has been carried out at various extraction times and temperatures. The purpose of this study was to obtain the optimum time and temperature of ultrasonic for yield and free radical scavenging activity of binahong leaves using Response Surface Methodology (RSM) with the Central Composite Design method. Binahong leaves were extracted at three levels of time (10, 20, 30 minutes) and temperature (40, 45, 50°C) with a frequency of 40 kHz using an ultrasonic bath. The results showed that at a temperature of 45°C for 20 minutes obtained the highest yield of 10.44%, with a predictive value of RSM 10.15%. At a temperature of 40°C for 30 minutes, the optimum value of the free radical scavenging activity of binahong leaf extract was obtained. The percent inhibition value was 55.92%, with a predictive value of 48.85%. Based on the results, the temperature and time variables have a significant effect on the percentage of extract yield and have no significant effect on free radical scavenging activity.*

### ABSTRAK

#### Pemanfaatan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Asal Kabupaten Bogor Sebagai Penangkal Radikal Bebas

Daun binahong memiliki senyawa flavonoid dan polifenol yang berpotensi sebagai penangkal radikal bebas. Telah dilakukan ekstraksi dengan menggunakan bantuan gelombang ultrasonik yang dilakukan dengan berbagai waktu dan suhu ekstraksi. Tujuan dari penelitian ini yaitu diperolehnya waktu dan suhu optimum ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik terhadap rendemen ekstrak dan aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) metode *Central Composite Design*. Daun binahong diekstraksi dengan 3 taraf waktu (10, 20, 30 menit) dan suhu (40°C, 45°C, 50°C) dengan frekuensi 40 kHz dengan menggunakan *ultrasonic bath*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada suhu 45°C pada waktu 20 menit diperoleh hasil rendemen ekstrak tertinggi yaitu 10,44% dengan nilai prediksi RSM 10,15% dan pada suhu 40°C dengan waktu 30 menit diperoleh nilai optimum terhadap aktivitas penangkal radikal bebas ekstrak daun binahong yaitu diperoleh nilai persen inhibisi 55,92% dengan nilai prediksi 48,85%. Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan bahwa variabel suhu dan waktu hanya berpengaruh nyata terhadap persentase rendemen ekstrak dan tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas penangkalan radikal bebas.

Kata kunci: Binahong, *Response surface methodology*, Rendemen ekstrak, Aktivitas penangkal radikal bebas

### PENDAHULUAN

Binahong merupakan tanaman yang memiliki genus *Anredera* dan merupakan Famili *Basellaceae*, pada beberapa penelitian menyatakan bahwa pada hasil isolasi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) mengandung saponin triterpen (Arif et al., 2008), flavonoid, steroid (Ayu et al., 2018) dan polifenol

(Kurniawan & Aryana, 2015). Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang terdapat di alam yang berpotensi sebagai penangkal radikal bebas (Parwati et al., 2014).

Penarikan suatu senyawa dalam daun binahong membutuhkan suatu metode ekstraksi. Dalam pengujian fitokimia, proses ekstraksi sangat penting karena dari tahap awal hingga akhir menggunakan proses ekstraksi. Ekstraksi



yaitu suatu metode pemisahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut tertentu. Suhu dan waktu merupakan parameter yang dapat mempengaruhi ekstraksi, sehingga peningkatan suhu dan waktu harus diperhatikan karena suhu yang terlalu tinggi dapat merusak bahan yang akan diproses dan waktu ekstraksi yang tepat dapat menghasilkan senyawa yang optimal (Ibrahim et al., 2015). Pada penelitian ini menggunakan ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik. Ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik yaitu ekstraksi yang dilakukan dengan bantuan gelombang ultrasonik pada frekuensi 20-2000 kHz (Sekarsari et al., 2019).

*Response Surface Methodology* yaitu suatu metode statistik dan matematik yang digunakan untuk membangun, mengembangkan serta mengoptimasi proses. Untuk mengetahui suhu dan waktu ekstraksi yang tepat maka dilakukan optimasi untuk menentukan nilai optimum dari variasi suhu dan waktu ekstraksi. Proses optimasi dilakukan dengan menggunakan RSM, karena pada penelitian Kunarto et al, (2019) menyatakan bahwa dengan menggunakan metode RSM dapat menghasilkan waktu, suhu dan konsentrasi pelarut yang optimal dari ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik.

Penelitian terkait optimasi suhu dan waktu pada ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik terhadap rendemen ekstrak dan aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong (*Anredera cordifolia*) menggunakan metode optimasi *Response Surface Methodology* (RSM) belum pernah dilaporkan. Berdasar uraian di atas maka sangat perlu dilakukan penelitian terkait optimasi suhu dan waktu ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik terhadap rendemen ekstrak dan aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong menggunakan metode optimasi RSM dengan rancangan *Central Composite Design*. Tujuan penelitian yaitu menentukan suhu dan waktu optimum ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik terhadap persentase rendemen ekstrak dan untuk mengetahui aktivitas penghambatan radikal bebas yang optimum pada ekstrak daun binahong.

## BAHAN DAN METODE KERJA

### Bahan dan Alat

Penelitian dilakukan pada Tahun 2021, di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor.

Bahan penelitian meliputi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen), metanol 96%, DPPH, vitamin C, air suling, heksana, pereaksi Dragendroff, pereaksi Bouchardat, pereaksi Mayer, larutan 10% besi (III), metanol 50%, asam klorida (HCl), serbuk Mg, serbuk Zn, pereaksi Liebermann-Burchard, gelatin, larutan 3% besi (III), natrium klorida (NaCl). Alat penelitian meliputi timbangan analitik, blender, ayakan 40 mesh, sonikator, *rotary evaporator*, pipet tetes, alat-alat gelas, *waterbath*, spektrofotometer UV-Vis, alat sentrifugasi, Alat Pelindung Diri (APD), kertas saring Whattman, aluminium foil.

### Metode

#### Pengumpulan bahan dan determinasi

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan yaitu seluruh bagian daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) yang diperoleh dari Kabupaten Bogor. Selanjutnya determinasi dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Kebun Raya Bogor.

#### Pembuatan serbuk daun binahong

Seluruh bagian daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) segar sebanyak 17,889 kg dicuci dan disortasi basah. Selanjutnya daun dikeringkan di bawah sinar matahari langsung. Kemudian daun binahong yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 40 mesh.

#### Optimasi ekstraksi dengan *Response Surface Methodology* (RSM)

Proses ekstraksi berdasarkan hasil analisis perangkat lunak *Design Expert 11.1.2.0 Trial* dengan menggunakan rancangan percobaan *Central Composite Design*. Faktor atau variabel yang digunakan yaitu suhu ekstraksi yaitu 40°C, 45°C, 50°C dan waktu ekstraksi 10, 20, 30 menit (Sekarsari et al., 2019). Setelah data dimasukkan ke dalam perangkat lunak *Design Expert 11.1.2.0 Trial*, akan diperoleh 13 kombinasi perlakuan untuk ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik.

Pembuatan ekstrak daun binahong berdasarkan hasil kombinasi analisis perangkat lunak yaitu dengan cara serbuk daun binahong ditimbang 100 gram dengan menggunakan pelarut metanol 95% 1000 mL (1:10). Kemudian sampel diekstraksi berdasarkan hasil 13 kombinasi analisis RSM dengan menggunakan alat sonikator dengan frekuensi gelombang 40 kHz. Selanjutnya ekstrak cair disaring dan dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator*.

Kemudian ekstrak cair dikentalkan dengan menggunakan *water bath* pada suhu 70°C hingga menjadi ekstrak pekat. Selanjutnya dihitung persentase rendemen ekstrak.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

Tabel 1. Hasil kombinasi perlakuan *Response Surface Methodology*

Std	Run	Suhu (°C)	Waktu (Menit)
12	1	45	20
10	2	45	20
1	3	40	10
5	4	38	20
7	5	45	6
2	6	50	10
9	7	45	20
3	8	40	30
6	9	52	20
4	10	50	30
8	11	45	34
11	12	45	20
13	13	45	20

#### Uji karakteristik simplisia dan ekstrak Uji kadar air

Uji kadar air ditentukan menggunakan metode gravimetri, yaitu dengan cara sampel sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam cawan penguap. Sampel dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, selanjutnya ditimbang sampai bobot konstan. Penetapan kadar air dilakukan secara duplo.

#### Uji kadar abu

Sampel sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam kurs porselin. Sampel dimasukkan ke dalam tanur dengan suhu  $\pm 600^\circ\text{C}$  dengan waktu 6 jam sampai arang habis. Pengujian dilakukan secara duplo.

#### Uji aktivitas penangkalan radikal bebas dengan metode DPPH (Utami *et al*, 2018)

##### a. Larutan DPPH 1 mM

DPPH sebanyak 98,58 mg ditimbang, dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL. DPPH dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol p.a hingga batas labu. Kemudian labu ukur dilapisi aluminium foil.

##### b. Larutan blanko

1 mL larutan DPPH 1mM dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah 10 mL metanol p.a dan dihomogenkan. Labu ukur dilapisi dengan

menggunakan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar yaitu 25-30°C.

##### c. Larutan baku vitamin C 100 mg/L

Vitamin C dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL sebanyak 100 mg, ditambahkan metanol p.a sampai batas labu (1000 mg/L). 10 mL larutan vitamin C 1000 mg/L dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dilarutkan dengan metanol p.a.

#### Penentuan panjang gelombang maksimum

Metanol p.a sebanyak 8 mL dipipet dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan diencerkan dengan metanol p.a sampai batas pada labu ukur 10 mL. Labu ukur dilapisi dengan aluminium foil dan selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.

#### Penentuan waktu inkubasi optimum

1 mL larutan standar vitamin C dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Metanol p.a 4 mL dan larutan DPPH 1 mM sebanyak 1 mL dipipet dan ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas labu. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum dan diukur pada waktu 10, 20, 30, 40, 50, 60 menit.

#### Pembuatan deret larutan standar vitamin C

Pembuatan deret vitamin C dengan variasi konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, 10 mg/L dibuat dalam labu ukur 10 mL. Larutan DPPH 1 mM sebanyak 1 mL dimasukkan dalam labu dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas labu. Selanjutnya larutan diinkubasi dengan waktu optimum dan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

#### Pembuatan larutan uji dari 13 kombinasi hasil analisis RSM

Larutan uji dibuat dengan cara membuat larutan induk 1000 mg/L. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Konsentrasi 50 mg/L dibuat dari larutan induk 1000 mg/L ke dalam labu ukur 10 mL. Metanol p.a 4 mL dan larutan DPPH 1 mM sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam labu lalu metanol p.a ditambahkan hingga tanda batas, kemudian labu dilapisi aluminium foil.

#### Pengujian penangkalan radikal bebas

Larutan uji dari 13 perlakuan, deret larutan kontrol positif vitamin C dan blanko diukur absorbannya dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Nilai persentase

hambatan DPPH dihitung dengan menggunakan nilai *IC* dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs blanko DPPH} - \text{Abs sampel}}{\text{absorbansi blanko DPPH}} \times 100 \%$$

### Pengolahan data

Hasil data persentase rendemen dan persentase inhibisi diperoleh dari hasil ekstraksi 13 kombinasi perlakuan, kemudian diolah dengan analisis RSM menggunakan perangkat lunak *Design Expert 11.1.2.0 Trial* dengan rancangan *Central Composite Design* (CCD) untuk menetapkan kondisi hasil optimum ekstraksi analisis RSM terhadap pengaruh pada faktor suhu dan waktu ekstraksi terhadap persentase rendemen dan uji aktivitas penangkal radikal bebas. kemudian data diuji dengan ANOVA menggunakan tingkat kepercayaan 95%.

### Uji fitokimia

#### Pengujian alkaloid

Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air. Selanjutnya larutan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit, larutan didinginkan dan disaring. Hasil filtrat digunakan untuk pengujian. Filtrat diteteskan pada kaca arloji, ditambahkan reagen Dragendroff, Mayer dan Bouchardat.

#### Pengujian flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menggunakan beberapa pereaksi flavonoid, yaitu

- a. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram, dilarutkan dalam 1 - 2 mL metanol 50%, jika perlu dengan menggunakan pemanasan di atas penangas air, kemudian larutan ditambahkan logam magnesium dan ditambahkan 5-6 tetes asam klorida pekat. Selanjutnya larutan dipanaskan beberapa menit di atas penangas air, warna merah hingga merah lembayung yang timbul menandakan adanya senyawa flavonon, flavonol, flavanonol, dan dihidroflavonol.
- b. Ekstrak ditimbang sebanyak 0,5 gram, dilarutkan dalam 1 - 2 ml metanol 50%, di panaskan diatas penangas air, kemudian larutan ditambahkan sedikit serbuk seng dan ditambahkan 5-6 tetes asam klorida pekat. Selanjutnya larutan dipanaskan beberapa menit di atas penangas air. Timbulnya warna merah lembayung menunjukkan adanya

senyawa dihidroflavonol, flavanon dan positif mengandung flavonoid jika larutan tidak berwarna atau berwarna merah muda lemah.

#### Pengujian steroid dan triterpenoid

Ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL heksana. Larutan dikocok perlahan dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Timbulnya warna merah atau ungu menunjukkan positif mengandung triterpenoid, dan larutan positif steroid jika larutan berubah menjadi warna biru atau hijau.

#### Pengujian saponin

Ekstrak daun binahong sebanyak 1 gram, ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan. Larutan dikocok kuat-kuat sampai menghasilkan busa, lalu ditambahkan asam klorida yang bertujuan agar busa tetap stabil.

#### Pengujian tanin

Ekstrak daun binahong ditimbang sebanyak 0,5 gram, ditambahkan aquadest panas lalu diaduk dan didinginkan. Selanjutnya ditambahkan larutan gelatin 10%, adanya tanin ditandai timbulnya endapan warna putih. Ekstrak ditambahkan NaCl-gelatin dengan perbandingan 1:1. Hasil positif tannin ditandai dengan timbulnya endapan pada larutan. Ekstrak ditambahkan dengan larutan 3% besi (III) klorida, adanya tanin ditandai timbulnya warna hijau biru hingga kehitaman.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil pembuatan serbuk

Daun binahong basah sebanyak 17,889 kg setelah dikeringkan dan diblender diperoleh 1,336 kg dengan persentase rendemen serbuk yaitu 7,4682. Serbuk daun binahong yang dihasilkan berwarna hijau, bau aromatik, serbuk kasar dan tidak ada rasa.

### Hasil uji karakteristik simplisia dan ekstrak

Penetapan kadar air yaitu tahapan standarisasi parameter nonspesifik dengan menggunakan metode gravimetri. Penetapan kadar air ini bertujuan untuk mengetahui rentang atau batas minimal kandungan air yang diperbolehkan dalam suatu bahan. Jika suatu bahan mengandung jumlah air yang tinggi maka akan semakin mudah ditumbuhi mikroorganisme

serta dapat merusak senyawa dalam simplisia dan dapat pula mengurangi umur simpan bahan (DepKes RI., 2000). Hasil penetapan kadar air serbuk daun binahong diperoleh rata-rata 6,4922 % dan kadar air ekstrak daun binahong diperoleh rata-rata 4,5949 %. Hasil penetapan kadar air sudah memenuhi syarat sesuai dengan literatur yaitu kurang dari 10% (BPOM et al., 2019).

Penetapan kadar abu bertujuan untuk mengidentifikasi zat anorganik dan mineral setelah proses pengabuan (Arif et al., 2008). Penetapan kadar abu yaitu dilakukan dengan cara sampel ditanur dimasukkan kedalam oven dengan suhu tinggi sampai menjadi abu dan menyisakan unsur-unsur mineral dan anorganik. Hasil penetapan kadar abu serbuk simplisia yaitu dengan rata-rata 6,26895 % dan kadar abu ekstrak daun binahong diperoleh rata-rata yaitu 6,0761 %. Hasil penetapan kadar abu simplisia dan ekstrak daun binahong sudah memenuhi syarat yaitu kurang dari 16,6 % (DepKes RI, 2008).

#### Hasil uji fitokimia serbuk dan ekstrak

Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan analisis kualitatif yaitu mengamati

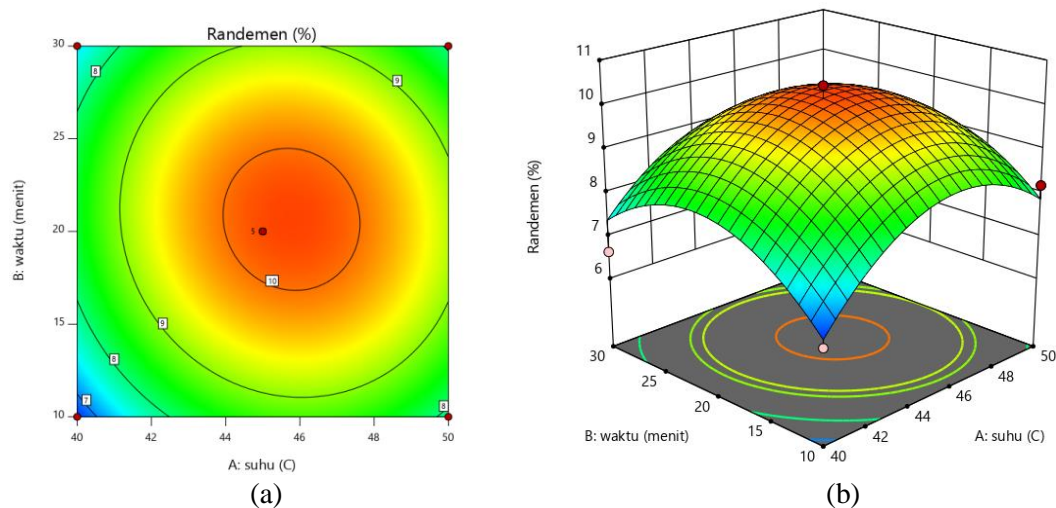
perubahan warna pada setiap penambahan pereaksi. Uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada ekstrak. Pengujian ekstrak daun binahong diantaranya yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, triterpen, saponin dan tanin.

Dari hasil pengamatan yang telah diperoleh pada uji fitokimia ekstrak daun binahong diperoleh bahwa reaksi positif terdapat pada senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, triterpen, saponin dan tanin. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Ayu et al., (2018) menyatakan bahwa ekstrak daun binahong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, triterpen dan saponin. Parwati et al., (2014) juga menyatakan bahwa daun binahong mengandung senyawa tanin. Sehingga pada penelitian ini tidak menyebabkan adanya perbedaan hasil pada penelitian sebelumnya.

Setelah diperoleh hasil persentase rendemen tertinggi selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan RSM dengan menggunakan rancangan *Central Composite Design* (CCD) untuk melihat kondisi optimal dari faktor-faktor ekstraksi yang digunakan.

Tabel 2 Hasil Optimasi Ekstraksi Daun Binahong

No.	Suhu (°C)	Waktu (Menit)	Rendemen (%)	Inhibisi (%)
1	45	20	<b>10,44</b>	46,17
2	45	20	10,43	49,54
3	40/	10	6,47	49,07
4	38	20	7,36	30,87
5	45	6	7,15	33,87
6	50	10	8,18	41,87
7	45	20	9,62	33,99
8	40	30	6,62	<b>55,92</b>
9	52	20	7,89	22,78
10	50	30	7,68	25,64
11	45	34	8,50	38,29
12	45	20	10,44	45,59
13	45	20	9,77	48,04



Gambar 1. *Contour plot* 2D terhadap rendemen ekstrak (a)  
*Surface plot* 3D terhadap rendemen ekstrak (b)

Pada Gambar 1 menunjukkan adanya interaksi antara faktor-faktor dari variabel ekstraksi yaitu suhu dan waktu terhadap persentase rendemen ekstrak. Semakin lama waktu ekstraksi mencapai titik waktu optimum maka semakin tinggi persentase rendemen ekstrak yang dihasilkan, karena kontak antara bahan yang digunakan dengan pelarut akan semakin tinggi. Sehingga kelarutan bahan yang digunakan akan terus meningkat hingga pelarut mencapai pada titik kesetimbangan. Namun, semakin lama waktu yang digunakan untuk ekstraksi serta melebihi waktu optimum maka rendemen ekstrak yang diperoleh akan menurun. Waktu ekstraksi yang terlalu lama dan melebihi waktu optimum akan merusak senyawa yang diekstrak (Andriani et al., 2019). Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu optimum ekstraksi yaitu pada menit ke 20.

Suhu ekstraksi juga mempengaruhi hasil rendemen ekstrak, apabila suhu yang digunakan saat ekstraksi semakin tinggi maka persentase rendemen yang dihasilkan akan meningkat. Namun, suhu ekstraksi yang terlalu tinggi akan menyebabkan menurunnya persentase rendemen ekstrak. Karena suhu yang terlalu tinggi dapat merusak senyawa bioaktif yang terdapat dalam bahan yang digunakan yaitu senyawa yang tidak tahan akan panas, sehingga rendemen yang dihasilkan akan menurun (Cahayanti et al, 2016). Dari hasil penelitian diperoleh suhu ekstraksi optimum pada suhu 45°C. Berdasarkan Gambar 1 *countour plot* 2D dan *surface plot* 3D, rendemen tertinggi berada di daerah berwarna merah dan bagian terendah berada didaerah berwarna biru.

Berdasarkan hasil uji *Analysis of Variance* (ANOVA) terhadap respon persentase rendemen ekstrak diperoleh nilai P 0,0012 yang artinya

model yang digunakan berpengaruh nyata atau signifikan terhadap respon. Respon berpengaruh nyata apabila nilai P kurang dari 5% (Ernes et al., 2014). Sedangkan nilai ketidaktepatan pengujian atau *lack of fit* diperoleh nilai *P-value* 0,1551 ( $>0,05$ ) tidak signifikan sehingga dapat disimpulkan bahwa model yang digunakan sudah sesuai. Berdasarkan model polinomial kuadratik diperoleh nilai  $R^2$  (koefisien determinasi) yaitu 0,9161 atau 91,26%, hal ini menunjukkan bahwa model sangat sesuai dan dapat digunakan untuk memprediksi persentase rendemen ekstrak dengan menggunakan UAE. Sedangkan nilai *Adjusted R*<sup>2</sup> yaitu 0,8562 atau 85,62% dimana nilai  $R^2 >70\%$  yang menunjukkan bahwa nilai actual dan prediksi cukup tepat dalam memberikan kedekatan hasil yang diperoleh (Sari et al., 2015).

Diperoleh persamaan kanonikal yang diperoleh dari analisis model dan ragam :

$$Y = 10,15 + 0,4437 A + 0,1946 B - 0,1632 A*B - 1,40 A^2 - 1,30 B^2 \quad (1)$$

Keterangan :

Y = Rendemen ekstrak (%)

A = Suhu (°C)

B = Waktu (Menit)

A\*B = Interaksi suhu dan waktu

A<sup>2</sup> = Waktu ditingkatkan dua kali

B<sup>2</sup> = Waktu ditingkatkan dua kali

Pada persamaan 1 menunjukkan bahwa persentase rendemen berbanding lurus dengan faktor suhu dan waktu, artinya kenaikan persentase rendemen dipengaruhi oleh kenaikan faktor suhu dan waktu yang ditandai dengan tanda positif pada persamaan, sedangkan pada faktor interaksi suhu dengan waktu dan faktor suhu dan waktu yang dinaikan dua kalinya akan

menyebabkan penurunan pada persentase rendemen yang ditandai dengan tanda minus pada persamaan.

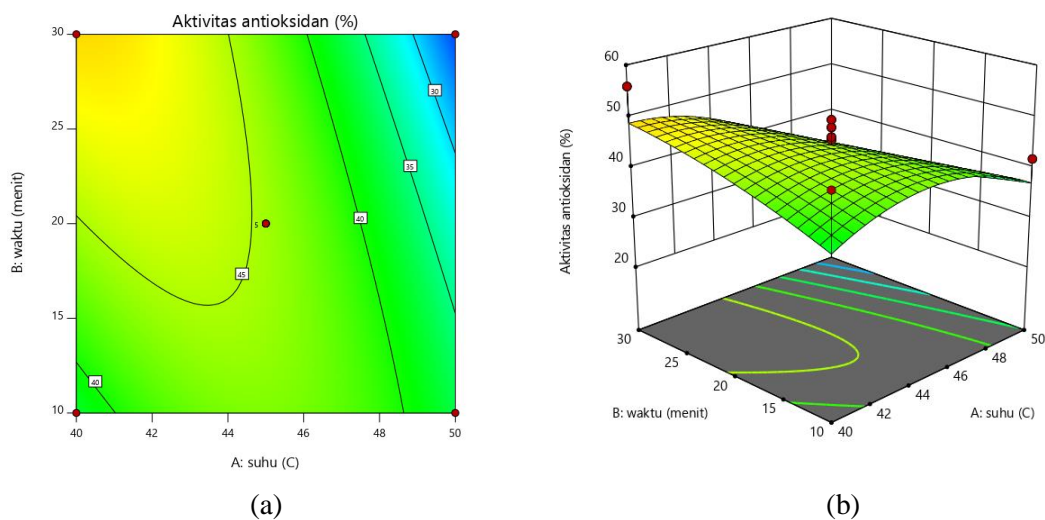
### Hasil optimasi uji aktivitas penangkalan radikal bebas ekstrak

Penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas penangkalan radikal bebas daun binahong menggunakan metode DPPH merujuk pada penelitian Jami'ah et al (2018).

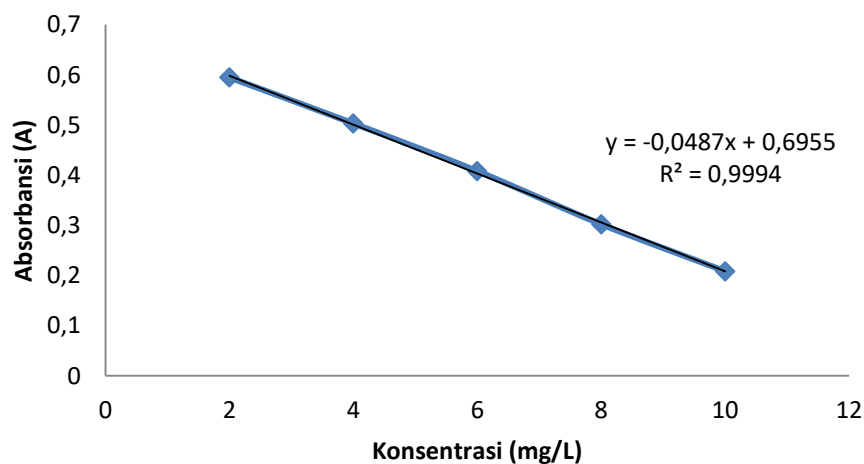
Pengujian aktivitas penangkalan radikal bebas dilakukan secara kuantitatif yaitu dengan mengukur absorbansi DPPH dengan menggunakan panjang gelombang dari DPPH yaitu 515,5 nm. Pada uji aktivitas penangkal radikal bebas perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Setelah diperoleh panjang gelombang maksimum DPPH, selanjutnya yaitu menentukan waktu inkubasi yang optimum. Waktu inkubasi

optimum merupakan waktu yang dapat mengoptimalkan antara reaksi DPPH dengan sampel yang akan diujikan. Dari hasil pengukuran diperoleh waktu inkubasi optimum yaitu 40 menit.

Berdasarkan Tabel 2 hasil dari optimasi daun binahong terhadap aktivitas penangkal radikal bebas dengan konsentrasi sampel 50 mg/L, diperoleh % inhibisi tertinggi yaitu pada suhu 40°C waktu 30 menit dengan nilai % inhibisi sebesar 55,92%. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas suatu penangkal radikal bebas dalam suatu bahan atau tanaman yaitu kandungan senyawa yang terdapat pada bahan tersebut, seperti flavonoid dan fenol (Andriani et al., 2019). Selain itu perbedaan metode ekstraksi dan perbedaan tempat pengambilan bahan atau tanaman juga berpengaruh terhadap kandungan senyawa dalam bahan tersebut.



Gambar 2. Contour Plot 2D terhadap aktivitas antioksidan (a)  
Surface plot 3D terhadap aktivitas antioksidan (b)



Gambar 3. Grafik kontrol vitamin C

Berdasarkan Gambar 2 hasil optimum aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong tertinggi ditandai dengan warna kuning sedangkan hasil terendah pada daerah berwarna biru. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa *Surface plot* 3D tidak membentuk parabola dikarenakan faktor-faktor atau variabel tidak berkaitan atau berhubungan dengan aktivitas penangkal radikal bebas, sehingga model yang digunakan tidak tepat. Karena aktivitas penangkal radikal bebas suatu bahan atau sampel dipengaruhi oleh kandungan senyawa pada bahan atau sampel.

Pembandingan yang digunakan pada pengujian aktivitas penangkal radikal bebas yaitu vitamin C. Dalam pengujian vitamin C dibuat terlebih dahulu larutan induk 100 mg/L yang diambil dari larutan 1000 mg/L, kemudian dibuat 5 deret yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/L. Tujuan pembuatan konsentrasi yaitu untuk membandingkan aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong dengan vitamin C. Vitamin C merupakan penangkal radikal bebas alami yang sangat kuat sehingga digunakan sebagai pembandingan.

Dari Gambar 3 diperoleh bahwa nilai  $R^2$  0,9994 mendekati nilai 1. Pada hasil optimasi penangkal radikal bebas ekstrak daun binahong pada suhu 40 waktu 30 menit diperoleh nilai persentase inhibisi 55,92% setara dengan persentase inhibisi vitamin C diantara konsentrasi 6 mg/L dan 8 mg/L. Kemampuan aktivitas penangkal radikal bebas daun binahong berkaitan dengan senyawa flavonoid yang terkandung pada daun binahong. Senyawa flavonoid dan fenol sangat berkaitan dengan aktivitas antioksidan, sehingga semakin tinggi kandungan flavonoid dan fenol pada bahan maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya (Zuraida et al., 2017). Selain flavonoid dan fenol, metabolit sekunder lainnya seperti terpenoid dan alkaloid juga dapat sebagai antioksidan (Antony et al., 2011). Menurut (Al-jaber et al., 2011) bahwa alkaloid, flavonoid, polifenol, terpenoid dan tanin dapat berperan sebagai antioksidan.

Perbandingan nilai prediksi dengan nilai aktual hasil optimasi yang diperoleh dari RSM yaitu 48,85 % sedangkan nilai aktual yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu 55,92 % dengan nilai residual standar error 7,08%. Dari nilai residual standar error melebihi 5% yang artinya berbeda dengan prediksi atau data yang diperoleh tidak menyebar dengan normal, yang berarti nilai aktual tidak mendekati nilai prediksi. Nilai residual standar error yaitu selisih antara

nilai respon dengan nilai respon aktual yang diprediksikan.

Hasil uji *Analysis of Variance* (ANOVA) terhadap aktivitas penangkal radikal bebas atau persentase inhibisi yaitu didapatkan nilai  $P$  0,2511 ( $>5\%$ ) atau tidak signifikan dimana variabel tidak berpengaruh nyata terhadap respon aktivitas penangkal radikal bebas. Nilai *lack of fit* yang diperoleh yaitu  $P$ -value 0,1267 ( $>0,05$ ) atau tidak signifikan terhadap ketidaktepatan artinya model yang digunakan sudah sesuai. Nilai  $R^2$  yaitu 0,5493 atau 54,93% dan nilai *Adjusted*  $R^2$  yaitu 0,2273 atau 22,73% ( $<70\%$ ) sehingga model yang digunakan tidak sesuai dan tidak dapat digunakan untuk memprediksi respon aktivitas penangkal radikal bebas dengan menggunakan variabel suhu dan waktu ekstraksi. Nilai *adjusted*  $R^2$  akan terjadi penurunan apabila variabel yang digunakan tidak memberikan pengaruh.

Diperoleh persamaan kanonikal yang diperoleh dari analisis model dan ragam :

$$Y = 44,57 - 6,16 A - 0,2843 B - 5,77 A*B - 5,97 A^2 - 1,41 B^2 \quad (2)$$

Keterangan :

Y = Aktivitas Penangkal radikal bebas (%)

A = Suhu ( $^{\circ}C$ )

B = Waktu (Menit)

A\*B = Interaksi suhu dan waktu

$A^2$  = Waktu ditingkatkan dua kali

$B^2$  = Waktu ditingkatkan dua kali

Pada persamaan diatas menunjukkan bahwa aktivitas penangkal radikal bebas tidak dipengaruhi oleh faktor suhu dan waktu sehingga pada hasil persamaan bernilai negatif.

## KESIMPULAN

Pada suhu  $45^{\circ}C$  dan waktu 20 menit diperoleh kondisi optimum ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik terhadap persentase rendemen dengan nilai rendemen 10,44 % dengan analisis RSM dan ekstrak daun binahong memiliki aktivitas penangkal radikal bebas paling optimum pada suhu  $40^{\circ}C$  dengan waktu ekstraksi 30 menit diperoleh nilai persentase inhibisi yaitu 55,92 %.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-jaber, N. A., Awaad, A. S., & Moses, J. E. (2011). Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(4), 293–307. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.07.004>

- Andriani, M., Permana, I.D.G.M., Widarta, I.W.R. (2019). Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan Dengan Metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE). *Jurnal Ilmiah Fitofarmaka*. 8(3), 330–340.
- Antony, M., Menon, D. B., James, J., S, L. D. M., Arun, K., & Thankamani, V. (2011). *Phytochemical analysis and antioxidant activity of Alstonia scholaris*. 3(26), 13–18. <https://doi.org/10.5530/pj.2011.26.3>
- Arif, R., Wardatun, S., & Weandarlina, I. Y. (2008). Isolasi dan identifikasi senyawa saponin ekstrak metanol daun. *Jurnal Farmasi*, 3–8.
- Ayu, P., Surbakti, A., Queljoe, E. De, & Boddhi, W. (2018). Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Pharmakon*, 7(3), 22–31. <https://doi.org/10.35799/pha.7.2018.20112>
- Cahayanti, I.A.P.A., Wartini, N.M., Wrasiaty., L.P. 2016. Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Karakteristik Pewarna Alami Buah Pandan. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 4(2), 32–41.
- Badan, K., Obat, P., & Makanan, D. A. N. (2019). *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 32 Tahun 2019 tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional, Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2019 Nomor 1294*. 1294.
- Ibrahim, A. martua, Yunianta, & Sriherfyna, F. H. (2015). Effect of Temperature and Extraction Time on Physicochemical Properties of Red Ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) Extract with The Additional of Honey Combination as Sweetener for Functi. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 3(2), 530–541.
- Jami'ah, S. R., Ifaya, M., Pusmarani, J., & Nurhikma, E. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Pisang Raja (*Musa Paradisiaca sapientum*) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Jurnal Mandala Pharmakon Indonesia*, 4(1), 33–38. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v4i1.22>
- Kurniawan, B., & Aryana, W. F. (2015). Binahong (*Cassia Alata* L) As Inhibitor Of *Escherichia Coli* Growth. *Faculty of Medicine Lampung University*, 4(4), 100–104.
- Kunarto, B., Sutardi., Supriyanto., Anwar, C. (2019). *Optimasi Ekstraksi Berbantu Gelombang Ultrasonik pada Biji Melinjo Kerikil (Gnetum gnemon L., 'Kerikil')* Menggunakan Response Surface Methodology. 8(3), 1–8.
- Moniharapon, P. J., Queljoe, E. De, & Simbala, H. (2016). Identifikasi Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tauge (*Phaseolus Radiatus* L.). *Pharmakon*, 5(4), 130–136. <https://doi.org/10.35799/pha.5.2016.13983>
- Parwati, N., Napitupulu, M., & Diah, A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis) dengan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(4), 206–213.
- Sari, B. L., Susanti, N., & Sutanto, S. (2015). Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 59–68. <https://doi.org/10.7454/psr.v2i1.3331>
- Sekarsari, S., Widarta, I. W. R., & Jambe, A. A. G. N. A. (2019). Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Dengan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(3), 267. <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i03.p05>
- Utami, N.F., Nhestricia, N., Maryanti, S., Tisya, T., Maysaroh, S. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Dari Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* P.) Berdasarkan Perbedaan Ekologi Dataran Tinggi di Pulau Jawa. *Fitofarmaka Jurnal Ilmu Farmasi* 8(1), 67–72.
- Zuraida., Sulistiyani., Sajuthi, D., Suparto, I.H. 2017. *Fenol, Flavonoid, Dan Aktivitas Antioksidan Pada Alstonia scholaris R. Br Stem Bark Extract*. 35(3), 211–219. <https://doi.org/10.20886/jphh.2017.35.3.211-219>

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan diberikan kepada para pakar/mitra bestari/rekan setara yang telah diundang sebagai penelaah oleh *Jurnal Sains Natural* dalam Volume 12 No. 1, Tahun 2022. Berikut ini adalah daftar nama pakar/mitra bestari/rekan setara yang berpartisipasi :

1. Prof. Dr. Mustanir, M.Sc (Kimia Organik, Universitas Syiah Kuala)
2. Prof. Dr. Adi Santoso (Kimia Analisis, Puslitbang Kehutanan)
3. Dr. Agung Abadi Kiswandono, (Kimia Analitik dan lingkungan, Universitas Lampung)
4. Dr. Endang Saepudin, M.Sc (Biokimia Medicine, Universitas Indonesia)
5. Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)
6. Dr. Ricson Pemimpin Hutagaol, M.Si (Kimia Bahan Alam, Universitas Nusa Bangsa)
7. Dra. Tri Retno Dyah Larasati, M. Si, (Kimia Lingkungan, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi-Badan Tenaga Nuklir Nasional)
8. Drs. Agus Taufiq, M.Si, (Kimia Anorganik, Politeknik AKA Bogor)
9. Dra. Lilis Sugiarti, M.Si (Bioteknologi, STIKES Cendekia Utama)
10. Dra. Febi Nurilmala, M.Si (Bioteknologi, Universitas Nusa Bangsa)
11. Mamay Maslahat, M.Si (Kimia Analitik, Universitas Nusa Bangsa)

## PEDOMAN PENULISAN

### A. Pedoman Umum

1. Naskah merupakan hasil penelitian otentik yang belum dipublikasikan di media publikasi atau penerbitan lainnya.
2. Naskah tidak mengandung unsur plagiarisme. Dewan redaksi akan langsung menolak teks yang terindikasi plagiarisme.
3. Naskah yang telah ditulis berdasarkan pedoman Sains Natural (dalam format MS Word, sesuai template), harus dikirim melalui Sistem Submission Online dengan menggunakan Open Journal System (OJS) di portal e-jurnal Sains Natural (<http://ejournalunb.ac.id/index.php/JSN>). Kemudian, daftarkan diri sebagai salah satu penulis atau reviewer.
4. Naskah yang tidak sesuai dengan pedoman penulisan Sains Natural akan dikembalikan kepada penulis sebelum proses *review*.
5. Naskah bisa ditulis baik dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris dengan bahasa standar. Naskah harus terdiri dari sepuluh (10) sampai tiga belas (13) halaman termasuk gambar dan tabel. Naskah ditulis di atas kertas ukuran A4 (210x297 mm), dengan margin 3 cm (kiri, kanan, bawah dan atas).
6. Teks naskah harus menggunakan huruf Times New Roman, ukuran huruf 11pt, 1 spasi baris, dalam satu kolom.
7. Kata-kata yang tidak umum atau dari bahasa asing dituliskan dengan format *Italic*. Untuk naskah dalam Bahasa Indonesia, sebaiknya hindari istilah asing. Setiap paragraf dimulai 10 mm dari sisi kiri perbatasan sementara tidak ada spasi di antara paragraf.
8. Tabel dan gambar ditempatkan di grup teks setelah teks. Setiap gambar harus diberi judul (Gambar) di bawah gambar dan diberi nomor dalam format penomoran Arab yang diikuti oleh judul gambar. Setiap tabel harus diberi judul tabel dan diberi nomor dalam format penomoran arab di atas tabel diikuti dengan judul tabel. Gambar lampiran jelas (ukuran font, resolusi dan ruang garis terlihat jelas). Gambar, tabel, dan bagan harus ditempatkan di tengah antara kelompok teks. Jika memiliki ukuran lebih besar, bisa diletakkan di tengah halaman. Tabel tidak boleh berisi garis vertikal, sedangkan garis horisontal hanya diijinkan untuk hal penting.

### B. Teks Naskah

#### 1. Judul

Judul harus ringkas dan informatif. Judul naskah harus ditulis dengan maksimal 12 (dua belas) kata (dalam Bahasa Indonesia) dan 10 (sepuluh) kata dalam bahasa Inggris, font berukuran 12pt, UPPERCASE, BOLD, dan dalam format teks rata tengah.

#### 2. Nama penulis dan afiliasinya

Nama dari masing-masing penulis dicantumkan dengan jelas dan harus menunjukkan penulis yang berperan sebagai koresponden. Alamat afiliasi penulis (tempat kerja sebenarnya dilakukan) dicantumkan di bawah nama. Tanggung jawab koresponden ini mencakup menjawab pertanyaan tentang Metodologi dan Bahan. Penulis juga mencantumkan alamat e-mail dan rincian kontak.

#### 3. Abstrak

Abstrak ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris. Teks ditulis dalam format Times New Roman, ukuran huruf 9pt, 1 spasi baris, sebanyak 75-250 kata dan diikuti oleh lima kata kunci. Abstrak harus menyatakan secara singkat tujuan penelitian, hasil utama, dan kesimpulan utama.

#### 4. Pendahuluan

Pada pendahuluan, sebutkan tujuan dan latar belakang yang memadai. Hindari survei literatur terperinci atau ringkasan hasilnya.

#### 5. Bahan dan Metode

Metode ini diimplementasikan untuk memecahkan masalah, termasuk metode analisis. Metode yang digunakan dalam pemecahan masalah penelitian dijelaskan pada bagian ini.

#### 6. Hasil dan Pembahasan

Hasil harus jelas dan ringkas. Pembahasan harus mengeksplorasi signifikansi hasil kerja, bukan mengulanginya. Hindari kutipan yang luas dan diskusi literatur yang dipublikasikan.

#### 7. Kesimpulan

Kesimpulan utama penelitian ini dapat disajikan dalam bagian Kesimpulan singkat.

#### 8. Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih dicantumkan pada bagian terpisah di bagian akhir artikel sebelum referensi. Pada ucapan terima kasih dicantumkan nama/organisasi/institusi yang memberikan bantuan selama penelitian (misal, Memberikan bantuan bahasa, menulis bantuan atau bukti membaca artikel, dll.).

#### 9. Referensi dan kutipan

Semua referensi yang digunakan harus diambil dari sumber utama (jurnal ilmiah dan yang paling sedikit adalah 80% dari semua referensi) yang diterbitkan dalam sepuluh tahun terakhir. Setiap naskah harus memiliki setidaknya sepuluh referensi. Referensi harus menggunakan "Mendeley" sebuah aplikasi manajemen referensi. Format penulisan yang digunakan dalam Sains Natural mengikuti format yang diterapkan oleh APA 6th Edition (American Psychological Association).