

repository.ub.ac.id

Studi Perbandingan Metode Refluks dan Menggunakan Bantuan *Microwave* dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh:

ASYFARIATUS ZULFA AZHAR
145090201111035



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Studi Perbandingan Metode Refluks dan Menggunakan Bantuan *Microwave* dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri

oleh:

ASYFARIATUS ZULFA AZHAR
145090201111035

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal.....**04 JAN 2018** dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang kimia

Pembimbing I

Dr. Warsito, MS.
NIP.195907121985031004

Pembimbing II

Dr. Elvira Dhiaul Iftitah, S.Si, M.Si
NIP. 197204191997022001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP. 197310202002121001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : ASYFARIATUS ZULFA AZHAR

NIM : 145090201111035

Jurusan : KIMIA

Penulis skripsi berjudul:

**Studi Perbandingan Metode Refluks dan Menggunakan Bantuan
Microwave dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol
dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2018

Yang menyatakan,



(Asyfarriatus Zulfa Azhar)

NIM. 145090201111035

Studi Perbandingan Metode Refluks dan Menggunakan Bantuan *Microwave* dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri

ABSTRAK

Sitronelal merupakan komponen utama minyak jeruk purut yang dapat digunakan sebagai bahan dasar sintesis turunan benzimidazol yang memiliki aktivitas antibakteri. Dalam penelitian ini, sitronelal dalam minyak jeruk purut (MJP) direaksikan dengan 1,2-fenildiamin menggunakan bantuan *microwave* dan metode refluks. Proses reaksi dilakukan dengan variasi waktu untuk mengetahui randemen tertinggi terbentuknya produk. Sintesis senyawa turunan benzimidazol lebih efektif dilakukan dengan menggunakan bantuan *microwave* dengan lama reaksi selama 60 menit. Identifikasi senyawa penyusun MJP dilakukan menggunakan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa, karakterisasi produk hasil sintesis dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan KG-SM. Produk hasil sintesis dengan bantuan *microwave* ditentukan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* dan EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*). Potensi sebagai senyawa antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat sebesar 10mm – 16,7 mm yang termasuk ke dalam kategori daya hambat kuat. Nilai konsentrasi hambat minimum benzimidazol terhadap *S. aureus* sebesar 3.12 µg/mL serta terhadap bakteri *S. typhi* dan EPEC pada konsentrasi 0.78 µg/mL dengan persen penghambatan berturut-turut adalah 99.94%, 99.86% dan 99.98%.

Kata kunci: sitronelal, benzimidazol, 1,2-fenildiamin, *microwave*, antibakteri

repository.ub.ac.id

Comparative Study of Reflux Methods and *Microwave* Assisted in Derivatization of Citronellal to Benzimidazole and Its Activity Test as Antibacterial

ABSTRACT

Citronellal is the major component of kaffir lime oil which can be used as the base material of synthesis benzimidazole derivative which has antibacterial activity. In this study, citronellal in kaffir lime oil (MJP) was reacted with 1,2-phenylenediamine using *microwave* assisted and reflux method. The reaction process is carried out with time variation to determine the highest yield of the product. The synthesis of benzimidazole derivatives is more effective by using *microwave* assisted as 60 minutes of reaction duration. The identification of MJP compounds was carried out using Gas Chromatography-Mass Spectrometer, synthesized product characterization was performed using UV-Vis, FTIR, and KG-SM spectrophotometers. Product benzimidazole derivative synthesized with microwave assisted is determined their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*). Potential as an antibacterial compound is shown by the formation of the inhibitory zone of 10 mm – 16.7 mm which belong to the category of strong inhibitory. The minimum inhibitory concentration values benzimidazole against *S. aureus* of 3.12 μ g/mL, as well as against the *S. typhi* and EPEC on concentration of 0.78 μ g/mL by the percent inhibition respectively are 99.94%, 99.86% and 99.98%.

Keywords: citronellal, benzimidazole, 1,2-phenylenediamine, *microwave*, antibacterial

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas penyertaan dan karunia-Nya sehingga dapat terselesaikannya penyusunan skripsi dengan judul “**Studi Perbandingan Metode Refluks dan Menggunakan Bantuan *Microwave* dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol dan Uji Aktivasnya sebagai Antibakteri**“. Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat kelulusan dan memperoleh gelar sarjana Sains (S.Si) dalam bidang kimia di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung ataupun tidak langsung sehingga dapat terselesaikan penyusunan skripsi ini dengan baik. Ucapan terimakasih tersebut penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Warsito, MS. dan Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si., M.Si selaku Pembimbing I dan Pembimbing II yang telah membimbing, memberikan pengarahan dan kesempatan untuk melakukan penelitian hingga penulisan Tugas Akhir ini dapat terlaksana.
2. Dra. Sri Wardhani, M.Si selaku Dosen Penasehat Akademik atas bimbingan dan pengarahan yang telah diberikan kepada penulis.
3. Dosen penguji seminar proposal, kemajuan (Dr. Rurini Retnowati, M.Si) dan penguji ujian akhir skripsi atas saran kepada penulis.
4. Masruri, S.Si, M.Si.,Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya serta segenap staf pengajar atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
5. Kedua orang tua tercinta, kakak, adik serta keluarga besar terkasih atas doa dan dukungan pada penulis hingga terselesaikannya Skripsi ini.
6. Rekan-rekan bidang minat Organik, kimia angkatan 2014 khususnya kelas B dan seluruh teman-teman serta kakak tingkat Jurusan Kimia UB yang selalu membantu penulis.
7. Teman-teman SMP, SMA yang hingga sampai saat ini menyediakan waktu, semangatnya dan berbagi ilmu dalam proses penyelesaian Skripsi ini.
8. Seluruh pihak laboratorium dan instansi terkait atas



terselesaikannya penelitian dan penulisan Skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan wawasan bagi penulis ataupun pembaca.

Malang, Januari 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Perkembangan Metode Sintesis Benzimidazol	5
2.2 Bioaktivitas Dari Senyawa Turunan Benzimidazol.....	6
2.3 Minyak Atsiri Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix D.C</i>)	7
2.3.1 Potensi Sitronelal dalam Minyak Atsiri Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix D.C</i>) Sebagai Bahan Dasar Sintesis	8
2.4 Metode Sintesis Secara Konvensional dan Menggunakan Microwave.....	9
2.5 Aktivitas Zat Antibakteri.....	10
2.5.1 Uji Aktivitas Antibakteri.....	11
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Alat Penelitian	13
3.3 Bahan Penelitian.....	13
3.4 Tahap Penelitian.....	13

3.5	Prosedur Kerja.....	14
3.5.1	Identifikasi komposisi senyawa penyusun dalam minyak jeruk purut	14
3.5.2	Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan metode Refluks.....	14
3.5.3	Sintesis senyawa benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan bantuan <i>Microwave</i>	15
3.5.4	Karakterisasi produk hasil sintesis	16
3.5.4.1	Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR	16
3.5.4.2	Karakterisasi dengan Spektrofotometer UV-Vis	16
3.5.4.3	Karakterisasi dengan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (GCMS).....	16
3.5.5	Uji Aktivitas Antibakteri.....	16
3.5.5.1	Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri	17
3.5.5.2	Pembuatan Suspensi Bakteri.....	17
3.5.5.3	Penentuan Zona Hambat Dengan Metode Difusi Sumuran	17
3.5.5.4	Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	18
3.5.6	Analisis Data	18

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Identifikasi Komponen Minyak Jeruk Purut (MJP)	20
4.2	Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan metode refluks dan <i>microwave</i>	22
4.3	Penentuan waktu optimum senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis menggunakan metode refluks dan bantuan <i>microwave</i>	24
4.4	Karakterisasi produk hasil sintesis	27
4.4.1	Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	27
4.4.2	Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Spektrofotometer FTIR	28
4.4.3	Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa	31



4.5 Uji Aktivitas Antibakteri..... 32

4.5.1 Penentuan Zona Hambat Turunan Benzimidazol..... 32

4.5.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Benzimidazol ... 34

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan..... 37

5.2 Saran..... 37

DAFTAR PUSTAKA 38

DAFTAR LAMPIRAN 44



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Sintesis Benzimidazol [17].....	6
Gambar 2.2	Sintesis senyawa 2-aril-1- (arilmetil) -1H-benzimidazol [18]	6
Gambar 2.3	Struktur Sitronelal [25].....	8
Gambar 4.1	Kromatogram Minyak Jeruk Purut.....	20
Gambar 4.2	Mekanisme reaksi sintesis senyawa turunan benzimidazol	24
Gambar 4.3	Spektra produk bahan utama MJP dan produk hasil sintesis dengan bantuan <i>microwave</i>	27
Gambar 4.4	Spektra FT-IR (a) turunan benzimidazol hasil sintesis metode refluks, (b) turunan benzimidazol hasil sintesis menggunakan bantuan <i>microwave</i> , (c) MJP dan (d) 1,2-fenildiamin.....	29
Gambar 4.5	Kromatogram senyawa hasil sintesis dengan bantuan <i>microwave</i> (t: 60 menit).....	31
Gambar 4.6	Zona Hambat Yang Terbentuk Pada Larutan Uji Benzimidazol Berbagai Media Biakan Bakteri	32

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Tabulasi hasil identifikasi KG-SM Minyak Jeruk Purut... 21

Tabel 4.2 Tabulasi hasil sintesis benzimidazol menggunakan metode refluks 25

Tabel 4.3 Tabulasi hasil sintesis benzimidazol menggunakan bantuan *microwave*..... 25

Tabel 4.4 Tabulasi puncak serapan bilangan gelombang bahan utama dan hasil sintesis 30

Tabel 4.5 Tabulasi hasil identifikasi KG-SM senyawa hasil sintesis 32

Tabel 4.6 Diameter zona hambat benzimidazol..... 33

Tabel 4.7 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*..... 35

Tabel 4.8 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella* 35

Tabel 4.9 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*)..... 36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Kerja	44
A.1 Diagram Alir Penelitian.....	44
A.2 Identifikasi komposisi senyawa penyusun dalam minyak jeruk purut menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa	45
A.3 Sintesis senyawa benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut dengan <i>Microwave</i>	45
A.4 Sintesis senyawa benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut dengan Refluk	46
A.5 Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa, Spektrofotometer UV-VIS, dan Spektrofotometer Inframerah	47
A.6 Uji aktivitas antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> dan EPEC(<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>).....	48
A.6.1 Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri	48
A.6.2 Pembuatan Suspensi Bakteri	48
A.6.3 Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Sumuran	49
A.6.4 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	49
Lampiran B. Perhitungan.....	50
B.1 Perhitungan Massa Teoritis Produk Benzimidazol.....	50
B.2 Perhitungan Perbandingan Volume MJP dan 1,2-fenildiamin yang digunakan	51
B.3 Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Benzimidazol	52
B.4 Pengenceran Konsentrasi Benzimidazol Untuk Uji MIC	52
B.5 Perhitungan Jumlah Bakteri.....	52
B.6 Perhitungan Zona Hambat Benzimidazol	53
B.7 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum	53
Lampiran C. Data Hasil KG-SM.....	54
C.1 Kromatogram MJP	54



C.2 Data Spektra Massa komponen Minyak Jeruk Purut...	54
C.3 <i>Total ionic chromatogram</i> (TIC) dan spektra massa senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis dengan <i>microwave</i>	56
Lampiran D. Data Hasil Spektrofotometer UV-Vis	56
D.1 Spektra Minyak Jeruk Purut	56
D.2 Spektra senyawa turunan benzimidazol metode <i>microwave</i> (t= 60 menit).....	57
Lampiran E. Data Hasil Spektrofotometer FT-IR	57
E.1 Spektra MJP	57
E.2 Spektra 1,2-fenildiamin.....	58
E.3 Spektra senyawa turunan benzimidazol dengan bantuan <i>microwave</i> (t= 60 menit).....	58
E.4 Spektra senyawa turunan benzimidazol dengan metode refluks (t= 8jam).....	59
Lampiran F. Fragmentasi	59
F.1 Fragmentasi Sitronelal	59
F.2 Fragmentasi senyawa hasil sintesis turunan benzimidazol	60
Lampiran G. Dokumentasi Kegiatan	61

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
MJP	minyak jeruk purut
$^{\circ}\text{C}$	derajat Celsius
δ	delta
ρ	phi
USD	dolar
β	beta
α	alfa
mL	mililiter
g	gram
GHz	gigahertz
μg	microgram
μL	microliter
TIC	<i>total ionic chromatogram</i>
SI	<i>similarity index</i>
m/z	massa per rasio muatan
V	volume
Mr	massa molekul relatif
%	persen
λ	panjang gelombang
mm	millimeter
CFU	jumlah koloni bakteri

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Benzimidazol merupakan senyawa organik yang terdiri dari gugus fenil dan gugus imidazol. Beberapa studi menunjukkan bahwa adanya gugus fenil tersubstitusi pada cincin imidazol meningkatkan aktivitas antibakteri suatu senyawa. Benzimidazol dapat disintesis melalui reaksi antara 1,2-fenildiamin dengan turunan asam karboksilat atau aldehid [1,2]. Metode sintesis yang baik digunakan antara 1,2-fenildiamin dengan aldehid dilakukan menggunakan katalis asam atau dengan kondisi tertentu menggunakan metode kondensasi [1]. Mekanisme kondensasi diawali dengan adanya adisi yang melibatkan ion enolat dan senyawa yang memiliki gugus karbonil [3]. Senyawa turunan aldehid atau asam karboksilat dapat diperoleh dari alam, misalnya minyak atsiri yang mengandung senyawa mayor seperti sitronelal [2].

Minyak atsiri merupakan minyak yang terdiri dari campuran zat yang bersifat mudah menguap dan memiliki bermacam-macam komponen dengan titik didih yang berbeda. Minyak atsiri banyak digunakan dalam industri sebagai pemberi aroma dan rasa terutama banyak digunakan dalam industri makanan, minuman, farmasi, parfum, serta pewarna. Salah satu sumber daya alam yang potensial di Indonesia adalah tanaman jeruk purut yang keberadaannya tiap tahun cukup melimpah. Jeruk purut dapat dimanfaatkan sebagai bahan aditif dalam makanan maupun minuman. Kadar dari komponen minyak atsiri dan kualitas minyak akan menentukan nilai jual dari minyak atsiri. Minyak atsiri jeruk purut dalam perdagangan internasional dikenal dengan nama *kaffir lime oil* dengan nilai jual sebesar USD 65,00-75,00 per kilogram. Minyak atsiri jeruk purut yang berasal dari daun jeruk purut memiliki komponen sitronelal 81,9%, sitronelol 8,22%, linalol 3,69%, geraniol 0,31% dan komponen-komponen lain sebesar 6,29%. Tingginya kandungan sitronelal dalam minyak atsiri jeruk purut dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar sintesis benzimidazol serta meningkatkan aktivitas antibakteri senyawa tersebut [4]. Menurut Prabawati, dkk [5] suatu senyawa yang memiliki gugus C=C dan C=O yang saling berkonjugasi dengan cincin aromatik dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Hal ini dikarenakan senyawa elektronegatif dapat mengganggu proses biologis dengan menghambat sintesis dinding sel dari bakteri.

repository.ub.ac.id

Sitronelal merupakan senyawa aldehida tak jenuh yang mempunyai satu atom karbon asimetris pada C nomor tiga, yang dibentuk oleh metabolisme sekunder dari tanaman. Sitronelal dapat digunakan sebagai bahan baku dalam sintesis organik senyawa alami maupun non alami seperti sintesis feromon, sintesis senyawa siklik dan polisiklik, dan sintesis senyawa alisiklik [6]. Benzimidazol dan minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix D. C*) mengandung komponen dalam jumlah besar yang memiliki potensial sebagai antibakteri. Untuk meningkatkan aktivitas antibakteri suatu senyawa, dapat dilakukan sintesis benzimidazol dari senyawa aldehyd dengan 1,2-fenildiamin agar diperoleh hasil yang lebih efektif [7]. Sebagian besar metode sintesis konvensional yang sering digunakan untuk sintesis secara langsung bersifat tidak ramah lingkungan [8]. Metode sintesis secara konvensional membutuhkan waktu reaksi yang sangat lama, menghasilkan pencemaran terhadap lingkungan lebih tinggi, dan energi yang dihasilkan cukup rendah. Sehingga diperlukan metode reaksi yang sederhana, lebih cepat dengan energi yang dihasilkan tinggi, efektif serta mendukung terlaksananya *Green Chemistry* dengan menggunakan metode *microwave* [9]. Safitri, dkk [10] menyatakan bahwa metode *microwave* adalah proses kimia yang menggunakan *microwave* dalam reaksinya dengan memanfaatkan radiasi gelombang mikro yang berada dalam spektra elektromagnetik berada di antara radiasi gelombang inframerah dan gelombang radio. Kelebihan menggunakan metode *microwave* yaitu waktu reaksi yang singkat dan hasil reaksi optimum yang sangat membantu dalam peningkatan produk pada sebuah industri.

Berdasarkan hal di atas maka dalam penelitian ini dibuat derivatisasi sitronelal menjadi produk benzimidazol yang lebih aman, cepat dan efektif serta uji aktivitas sebagai antibakteri. Produk senyawa turunan benzimidazol dapat diamati dari kedua metode tersebut melalui variasi waktu sintesis serta dilakukan uji aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*, bakteri gram negatif *Salmonella typhi* dan EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang dapat diambil adalah:

1. Berapakah waktu optimum dalam sintesis senyawa turunan benzimidazol dengan metode refluks dan menggunakan bantuan *microwave*.
2. Apakah metode sintesis senyawa turunan benzimidazol dengan bantuan *microwave* lebih efektif dibandingkan metode refluks.
3. Apakah senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *S. typhi* dan EPEC.

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah diatas, batasan masalah yang dapat diambil adalah:

1. Minyak jeruk purut yang digunakan sebagai sampel yaitu hasil penyulingan campuran ranting dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix D.C.*) yang diperoleh dari Institut Atsiri Universitas Brawijaya Malang
2. Pelarut yang digunakan dalam sintesis diklorometan *pro-analysis*
3. Perbandingan mol minyak jeruk purut dengan reagen 1,2-fenildiamin adalah sama yaitu (2:1).
4. Variasi waktu yang digunakan untuk mereaksikan adalah 4, 6, 8, 10, dan 12 jam pada metode refluks serta 30, 40, 50, 60, 70 menit pada bantuan *microwave*.
5. Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan meliputi metode difusi sumuran dan metode dilusi.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menentukan waktu optimum dalam sintesis senyawa turunan benzimidazol dengan metode refluks dan menggunakan bantuan *microwave*.
2. Mengetahui keefektifan metode sintesis senyawa turunan benzimidazol dengan metode refluks dan menggunakan bantuan *microwave*.

3. Mengetahui aktivitas senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *S. typhi* dan EPEC.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan, antara lain:

1. Dapat meningkatkan nilai ekonomi dari minyak atsiri jeruk purut.
2. Dapat digunakan sebagai dasar dalam menghasilkan senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri.



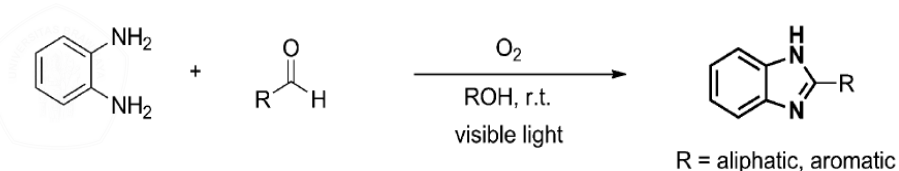
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perkembangan Metode Sintesis Benzimidazol

Beberapa tahun terakhir, penelitian mengenai aktivitas benzimidazol telah menjadi bahan yang cukup menarik untuk diteliti. Terutama apabila dilakukan perkembangan dan strategi baru untuk memperoleh senyawa turunan benzimidazol dengan aktivitas biologi yang lebih baik [11]. Benzimidazol dapat ditingkatkan aktivitas antibakterinya dengan cara disintesis melalui reaksi kondensasi antara 1,2-fenildiamin dengan turunan asam karboksilat atau aldehid dalam suasana asam [1].

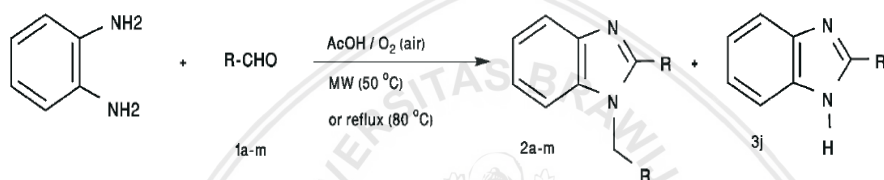
Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, benzimidazol disintesis dari beberapa reaktan 1,2-fenildiamin dan aldehid seperti: sintesis benzimidazol dari 1,2-fenildiamin dengan aldehid aromatik tanpa pelarut menggunakan iradiasi gelombang mikro [12]. Sintesis benzimidazol dari 1,2-fenildiamin dengan aldehid dalam PEG dan Ceric ammonium nitrate (CAN) menghasilkan yield yang baik [13]. Sintesis benzimidazol juga dilakukan antara 1,2-fenildiamin dengan aldehid tanpa pelarut dengan menggunakan $TiCl_4$ sebagai katalis, metode berlaku bagi aromatik, senyawa tak jenuh dan aldehida alifatik [14]. Benzimidazol yang dihasilkan memiliki yield lebih baik jika digunakan katalis $BF_3 \cdot OEt_2$ dalam reaksi antara 1,2-fenildiamin dengan aldehid [15].

Metode yang digunakan dalam sintesis benzimidazol merupakan metode konvensional dan metode *microwave* dimana melibatkan suatu pelarut polar. Sintesis senyawa turunan benzimidazol berlangsung melalui reaksi kondensasi antara sitronelal yang memiliki gugus aldehid direaksikan dengan 1,2-fenildiamin [7]. Pasangan elektron bebas dari gugus amina berperan sebagai nukleofil yang menyerang gugus karbonil dari sitronelal dan akan dihasilkan turunan benzimidazol. Reaksi kondensasi dihasilkan dari serangan elektron dari ikatan π terhadap karbokation [16]. Metode umum yang melibatkan reaksi kondensasi antara 1,2-fenildiamina dengan aldehida dan senyawa turunan karbonil lainnya seperti asam karboksilat, asam halida dilakukan menggunakan iridiasi cahaya tampak untuk meningkatkan tingkat efektifitas (**Gambar 2.1**) [17].



Gambar 2.1 Sintesis benzimidazol [17]

Azarifar, dkk [18] juga melaporkan penggunaan asam asetat dalam sintesis senyawa turunan benzimidazol melalui reaksi kondensasi sederhana yang melibatkan 1,2-fenildiamin dengan turunan aldehida. Reaksi dilakukan dengan pemanasan konvensional dan bantuan iradiasi gelombang mikro seperti ditampilkan dalam **Gambar 2.2**.



Gambar 2.2 Sintesis senyawa 2-aryl-1-(arilmetil) -1H-benzimidazol [18]

2.2 Bioaktivitas Dari Senyawa Turunan Benzimidazol

Senyawa benzimidazol lebih banyak digunakan sebagai obat atau pengembangan obat dan sebagai objek penelitian untuk menentukan selektifitas senyawa tersebut. Beberapa turunan benzimidazol memiliki aktivitas biologis yang luas sehingga dapat digunakan sebagai obat analgesik [19], antibakteri [20], antijamur [21], anti-inflamasi, antikanker maupun diabetes [22]. Turunan benzimidazol juga menunjukkan aktivitas yang signifikan terhadap beberapa virus, seperti HIV, Influenza, Herpes dan *human cytomegavirus* (HCMV) [2].

Turunan benzimidazol memiliki aktivitas biologis yang luas, seperti dalam penelitian sebelumnya dijelaskan aktivitas analgesik senyawa turunan benzimidazol ini diuji dengan menggunakan *tail-flick* dan metode *tail-immersion*. Agen analgesik kontrol yang digunakan adalah morfin sulfat dan asam asetilsalisilat yang memiliki aktivitas analgesik *tail-clip* lebih dari 95%. Senyawa-senyawa turunan benzimidazol menunjukkan aktivitas cukup dekat dengan control asam asetilsalisilat dan morfin yaitu

sekitar 86-74% dan bisa dikatakan memiliki aktivitas analgesik yang kuat terhadap rangsangan fisik [19]. Selain itu, turunan imidazol lain adalah metronidazol yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Helicobacter pylori*. Aktivitas biologis senyawa ini dibandingkan dengan suatu antibakteri yang biasa digunakan secara umum yaitu klaritromisin dan amoksisilin [23]. Sedangkan, turunan benzimidazol yang banyak digunakan sebagai fungisida adalah thiabendazol, carbendazim dan fuberidazol.

Dalam penelitian Lezcanok, dkk [21] dilakukan kompleksasi terhadap ketiga fungisida turunan benzimidazol dengan siklodekstrin untuk meningkatkan kelarutannya di dalam air. Beberapa turunan imidazol juga bersifat antijamur seperti mikonazol, klotrimazol dan ketokonazol. Ketokonazol merupakan antijamur berspektrum luas yang berefek fungistatik dan fungisidal dengan cara menghambat biosintesis lipid jamur.

2.3 Minyak Atsiri Jeruk Purut (*Citrus hystrix D.C*)

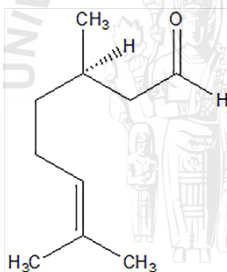
Istilah minyak atsiri digunakan untuk minyak yang berasal dari hasil penyulingan metabolit sekunder tanaman dan bersifat volatil atau mudah menguap [4], [24]. Minyak atsiri terdiri dari campuran zat yang memiliki titik didih dan tekanan uap tertentu, umumnya tekanan uap sangat rendah terdapat pada senyawa organik dengan titik didih yang tinggi. Sedangkan aroma khas minyak atsiri dihasilkan dari sifat mudah menguap senyawa-senyawa terpenoid hasil fraksi minyak atsiri yang tersuling oleh uap [25]. Oleh karena itu minyak atsiri biasa digunakan sebagai zat pemberi rasa pada parfum, olahan makanan maupun minuman [26].

Kualitas minyak atsiri ditentukan oleh karakteristik alami dari minyak tersebut dan bahan-bahan asing di dalamnya yang dapat merusak mutu minyak atsiri. Komponen standar mutu minyak atsiri ditentukan oleh kualitas dari minyak itu sendiri dan kemurniannya. Kemurnian minyak bisa diperiksa dengan penetapan kelarutan uji lemak dan mineral. Selain itu, faktor yang menentukan mutu adalah sifat-sifat fisika-kimia minyak, seperti bilangan asam, bilangan ester dan komponen utama minyak, dan membandingkannya dengan standar mutu perdagangan yang ada. Faktor lain yang berperan dalam mutu minyak atsiri adalah jenis tanaman, umur panen, perlakuan bahan sebelum penyulingan, jenis peralatan yang digunakan dan perlakuan minyak setelah penyulingan, kemasan dan penyimpanan [27].

Jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan salah satu tanaman yang berasal dari suku Rutaceae yang telah lama dikenal masyarakat sebagai bahan cita rasa [28]. Minyak atsiri jeruk purut merupakan minyak atsiri yang berasal dari tanaman jeruk purut dari berbagai bagian tanaman, seperti daun, bunga, buah, kulit, biji atau ranting. Minyak atsiri ini banyak digunakan dalam industri misalnya dalam industri olahan makanan, minuman, kosmetik dan wewangian [4].

2.3.1 Potensi Sitronelal dalam Minyak Atsiri Jeruk Purut (*Citrus hystrix D.C*) Sebagai Bahan Dasar Sintesis

Sitronelal (3,7-dimetil-6-oktenal, **Gambar 2.3**) merupakan senyawa monoterpene yang dibentuk oleh metabolisme sekunder dari tanaman. Sitronelal memiliki gugus aldehida, ikatan rangkap dan rantai karbon yang memungkinkan untuk mengalami reaksi siklisasi aromatisasi. Monoterpene sendiri adalah komponen utama dalam minyak atsiri dengan aroma wangi yang khas seperti dari sejumlah spesies tanaman seperti *Cymbopogon* spp., *Citrus* spp., *Eucalyptus citriodora* dan *Melissa officinalis* [24].



Gambar 2.3 Struktur Sitronelal [26]

Menurut penelitian sebelumnya, sitronelal dapat digunakan sebagai bahan dasar sintesis pembuatan *fragrance* seperti sitronelol, isopulegol, mentol dan ester-ester lainnya yang mempunyai bau wangi yang khas serta dalam pembuatan hidroksi sitronelal. Hidroksi sitronelal merupakan salah satu senyawa yang memiliki bau sangat harum sehingga sejumlah orang menyebutnya sebagai *king of the parfumes* [29]. Selain itu, Lenardao, dkk [6] menyebutkan bahwa sitronelal dapat dimanfaatkan sebagai bahan awal sintesis feromon, senyawa siklik dan polisiklik serta senyawa alisiklik. Feromon dari semut *Camponotus vagus* dapat

disintesis dari (R)-sitronelal dengan penambahan dodesilmagnesium bromida. Sintesis metil-siklopentenoid dari (S)-sitronelal dengan mempertahankan pusat kiral. Senyawa alisiklik disintesis dalam enam langkah dari (S)-sitronelal direaksikan dengan alil magnesium klorida.

2.4 Metode Sintesis Secara Konvensional dan Menggunakan *Microwave*

Reaksi organik umumnya berlangsung cepat pada temperatur yang tinggi atau memerlukan pemanasan agar reaksi dapat berjalan dengan efektif [30]. Metode konvensional refluks memanfaatkan proses pemanasan reaktan secara terus-menerus yang dilakukan bersamaan dengan pendinginan uap kembali ke labu sebagai cairan. Hal ini bertujuan untuk memanaskan campuran dan meningkatkan suhu dari campuran [31]. Prinsip dari metode refluks adalah pencampuran senyawa-senyawa dengan pemanasan oleh pelarut dalam suatu labu berbentuk bulat untuk mengamati proses cairan mendidih yang terdapat pada tabung refluks yang telah dilengkapi pendingin. Pelarut yang terus bersirkulasi di dalam refluks akan mengalami penguapan, kemudian didinginkan oleh air yang mengalir dalam salah satu sisi kolom kondensor. Uap yang telah mengembun akan menetes kembali ke dalam campuran reaksi di dalam labu [32].

Penggunaan temperatur tinggi pada proses sintesis mengakibatkan penggunaan energi yang berlebihan dan biaya produksi yang tinggi, sehingga metode tersebut kurang efektif digunakan untuk produksi skala besar [32]. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode lain dalam sintesis untuk mengatasi penggunaan energi yang berlebihan serta meningkatkan keefisienan proses sintesis [8]. Penerapan pelaksanaan *Green Chemistry* atau lebih dikenal *Eco-Friendly Reaction* pada sintesis menjadi alternatif yang baik untuk mengurangi proses reaksi kimia yang sebagian besar tidak ramah lingkungan. Salah satu proses reaksi kimia yang mendukung *Green Chemistry* yaitu metode sintesis dengan menggunakan bantuan *Microwave*. Teknik ini memberikan kemudahan dengan proses sintesis yang lebih cepat, efisien dan ekonomis dalam sintesis molekul organik dalam jumlah besar [33]. Penggunaan *microwave* tidak hanya dapat mempercepat laju reaksi organik tetapi juga meningkatkan hasil dan selektivitas produk [34].

Reaksi senyawa organik dengan bantuan *microwave* memanfaatkan radiasi gelombang mikro dalam spektrum elektromagnetik yang berada

di antara radiasi gelombang inframerah dan gelombang radio [10]. Pemanasan *microwave* memanfaatkan gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang antara 0,01m hingga 1m pada frekuensi antara 0,3GHz hingga 30GHz untuk menghasilkan energi panas yang berinteraksi dengan medium atau material. Prinsip *microwave* didasarkan oleh adanya interaksi partikel bermuatan dengan gelombang elektromagnetik pada frekuensi tertentu yang menghasilkan panas. Pelepasan gelombang mikro akan menimbulkan getaran diikuti partikel-partikel di dalam material akan berputar secara terus-menerus sehingga menghasilkan energi untuk menaikkan kecepatan tumbukan dan mengubahnya menjadi energi panas [35].

2.5 Aktivitas Zat Antibakteri

Antibakteri merupakan zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu sistem metabolisme mikroba yang merugikan. Mikroorganisme berbahaya dapat menyebabkan infeksi dan menimbulkan penyakit serta merusak bahan pangan. Antibakteri termasuk ke dalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri [36]. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri yaitu mengganggu metabolisme sel bakteri, menghambat sintesis dinding sel, menghambat ketuhan permeabilitas dinding sel bakteri dan menghambat kerja enzim [37].

Aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti pH, suhu stabilitas senyawa, jumlah bakteri yang ada, lamanya inkubasi dan aktivitas metabolisme bakteri [37]. Beberapa bakteri patogen yang biasa digunakan dalam uji antibakteri diantaranya *Escherichia coli*, *S. typhi* dan *S. aureus* dapat menimbulkan infeksi dan intoksikasi pada manusia. Bakteri *E. coli*, *S. aureus* dan *S. typhi* dapat menyebabkan terjadinya enteritis dengan gejala timbulnya diare [38,39].

Senyawa benzimidazol yang memiliki aktivitas antibakteri contohnya senyawa turunan 2-(Phenoxymethyl)-1H-benzimidazol yang disintesis dari 1,2-fenildiamin dengan pemanasan konvensional. Senyawa turunan benzimidazol tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan metode difusi pada konsentrasi 100 µg / mL [40]. Selain itu enam senyawa turunan 2-benzimidazol-tersubstitusi yang disintesis dari 1,2-fenildiamin dengan asam amino atau asam anthranilat memiliki aktivitas antibakteri

terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *E. coli* [41].

2.5.1 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian mikrobiologi memanfaatkan mikroorganisme sebagai penentu konsentrasi komponen tertentu pada campuran suatu senyawa kimia yang memiliki potensi mutagenik atau karsinogenik. Kegunaan uji antibakteri adalah diperolehnya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Terdapat beberapa metode uji antibakteri seperti dijelaskan berikut ini [42]:

1. Metode difusi

a. *Metode disc diffusion*, untuk menentukan aktivitas agen antibakteri. Antibakteri diletakkan pada media agar padat yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar [42].

b. *Metode E-test*, digunakan untuk mengetahui konsentrasi minimal suatu antibakteri untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan plastik yang mengandung agen antibakteri dari kadar terendah hingga kadar tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih menunjukkan kadar agen antibakteri yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media padat [42].

c. *Ditch-plate technique*, pada metode ini sampel uji berupa agen antibakteri yang diletakkan pada wadah yang digunakan dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan bakteri uji digoreskan kearah wadah yang berisi agen antibakteri [42].

d. *Cup-plate technique*, metode ini serupa dengan *disc diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antibakteri yang akan diuji [42].

e. *Gradient plate technique*, pada metode ini konsentrasi agen antibakteri pada media agar bervariasi dari nol hingga maksimal. Media agar dicairkan dan ditambahkan larutan uji. Campuran kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring. Media kedua kemudian dituangkan di atasnya. Cawan diinkubasi selama

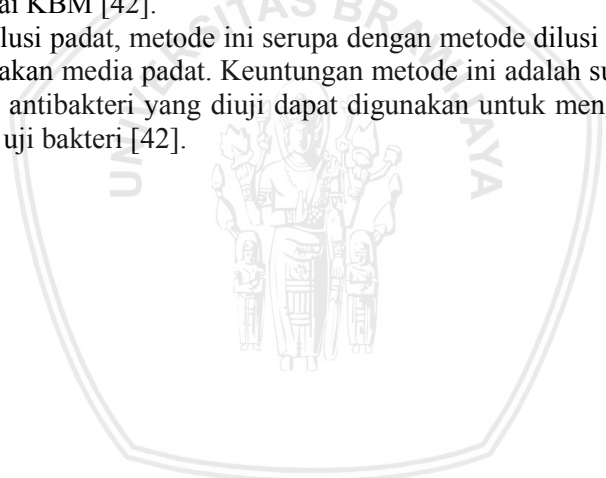
repository.ub.ac.id

24 jam untuk memungkinkan agen antibakteri berdifusi dan permukaan media mengering. Bakteri uji digoreskan pada arah mulai dari konsentrasi tinggi kerendah. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai panjang total pertumbuhan mikroorganismen maksimum yang dibandingkan dengan panjang pertumbuhan hasil goresan [42].

2. Metode dilusi

a. Metode dilusi cair, digunakan untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan memberi seri pengenceran agen antibakteri pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM [42].

b. Metode dilusi padat, metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Keuntungan metode ini adalah suatu konsentrasi agen antibakteri yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa larutan uji bakteri [42].



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Mei hingga November 2017 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur 10 mL, pipet ukur 10 mL, pipet tetes, bola hisap, labu alas bulat, labu alas bulat leher tiga, corong gelas, kondensor, Erlenmeyer 250 mL, gelas arloji, batang pengaduk, spatula besi, klem, statif, botol vial, botol sampel kaca, *microwave type LG MH6343BAK with Quartz Heater Technology*, seperangkat alat refluks, penggaris, kertas label, kertas saring, aluminium foil, kertas bungkus coklat, cawan petri, tabung reaksi, *coke bore*, mikrocup, bluetip, jarum ose, spreader, *haentoli counter*, *haemacytometer*, mikropipet, neraca analitik *Ohaus Precision Advanced*, mikroskop Olympus CX21, Spektrofotometer FT-IR, Kromatografi Gas-Spektrometer Massa, dan Spektrofotometer UV-VIS.

3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel minyak jeruk purut (*C. hystrix D.C*) hasil penyulingan campuran ranting dan daun jeruk purut (*Citrus hystrix D.C.*) yang diperoleh dari Institut Atsiri, padatan 1,2-fenildiamin $C_6H_4(NH_2)_2$, diklorometana *pro-analysis*, etanol *pro-analysis*, n-heksan *pro-analysis*, alkohol 70%, aquades, antibiotik *ampicillin*, bakteri biakan *S. aureus*, *S. typhi* dan EPEC, *nutrient agar*, *nutrient broth*.

3.4 Tahap Penelitian

1. Identifikasi komposisi senyawa penyusun dalam minyak jeruk purut.
2. Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut dengan metode refluks.
3. Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut dengan bantuan *microwave*.

4. Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa, Spektrofotometer UV-VIS, dan Spektrofotometer Inframerah.
5. Uji antibakteri terhadap *S. aureus*, *S. typhi* dan EPEC.
6. Analisis data.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Identifikasi komposisi senyawa penyusun dalam minyak jeruk purut

Diambil sebanyak 1 mL minyak jeruk purut menggunakan pipet ukur ke dalam botol vial. Kemudian diinjeksikan sebanyak 0,2 μL menggunakan *syringe* pada instrument Kromatografi Gas - Spektrometer Massa dengan tipe Shimadzu QP2010S. Masing-masing puncak yang terdeteksi discan untuk menghasilkan spektra massa. Spesifikasi dan tipe alat KG-SM yang digunakan adalah sebagai berikut:

Jenis kolom	: Kolom kapiler Restrex Rtx-5
Fasa diam	: 5% difenil atau 95% dimetil polisiloksan
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur oven kolom	: 40 °C
Tekanan	: 21,2 kPa
Total alir	: 94,7 mL/menit
Kolom Alir	: 0,66 mL/menit
Linear velocity	: 29,3 cm/detik
Purge Flow	: 3,0 mL/menit
Split ratio	: 138,1
Ion Source Temperature	: 250,00 °C
Interface Temperature	: 300,00 °C
Temperatur injeksi	: 310,00 °C
Laju	: 10°/menit
Awal	: 40°, hold 3 menit
Akhir	: 310°, hold 20 menit

3.5.2 Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan metode Refluks

Ditimbang sebanyak 0,7 g (0,05 mol) padatan 1,2-fenildiamin, lalu dimasukan labu alas bulat leher tiga. Kemudian diambil sebanyak 3 mL (0,1 mol) minyak jeruk purut dengan menggunakan pipet ukur serta 5 mL

diklorometana sebagai pelarut. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher tiga. Labu alas bulat leher tiga diletakkan di atas *heating mantle* dan dirangkai dalam susunan alat reflux. Pemanasan dijalankan dengan waktu sintesis 4 jam. Setelah selesai, labu alas bulat leher tiga didinginkan pada suhu ruang. Kemudian larutan hasil reaksi dimasukkan dalam botol kaca berwarna coklat dan disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Dalam kondisi dingin, filtrat dan padatan dipisahkan (disaring) menggunakan kertas saring yang ditempatkan di atas corong gelas. Padatan yang terbentuk dari hasil penyaringan dilakukan pencucian menggunakan pelarut diklorometana dingin hingga padatan berwarna putih. Padatan dikeringkan pada suhu ruang hingga komponen minyak jeruk purut dan diklorometana menguap. Padatan benzimidazol ditimbang dan disimpan dalam botol kaca berwarna coklat. Dengan cara yang sama, penelitian ini dilakukan pada variasi waktu sintesis 6, 8, 10, 12 jam sesuai prosedur kerja.

3.5.3 Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan bantuan *Microwave*

Ditimbang sebanyak 0,7 g (0,05 mol) padatan 1,2-fenildiamin, lalu dimasukkan labu alas bulat leher tiga. Kemudian diambil sebanyak 3 mL (0,1 mol) minyak jeruk purut dengan menggunakan pipet ukur serta 5 mL diklorometana sebagai pelarut. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher tiga. Labu alas bulat leher tiga diletakkan di atas *heating mantle* dan dirangkai dalam susunan alat *microwave*. Pemanasan dijalankan dengan waktu sintesis 30 menit. Setelah selesai, labu alas bulat leher tiga didinginkan pada suhu ruang. Kemudian larutan hasil reaksi dimasukkan dalam botol kaca berwarna coklat dan disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Dalam kondisi dingin, filtrat dan padatan dipisahkan (disaring) menggunakan kertas saring yang ditempatkan di atas corong gelas. Padatan yang terbentuk dari hasil penyaringan dilakukan pencucian menggunakan pelarut diklorometana dingin hingga padatan berwarna putih. Padatan dikeringkan pada suhu ruang hingga komponen minyak jeruk purut dan diklorometana menguap. Padatan benzimidazol ditimbang dan disimpan dalam botol kaca berwarna coklat. Dengan cara yang sama, penelitian ini dilakukan pada variasi waktu sintesis 40, 50, 60, dan 70 menit seperti prosedur diatas.

3.5.4 Karakterisasi produk hasil sintesis

3.5.4.1 Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Ditimbang padatan KBr sebanyak 200 mg kemudian dengan cara yang sama ditimbang padatan benzimidazol diambil 1 mg. Serbuk campuran padatan KBr dan benzimidazol ditumbuk hingga halus menggunakan mortar dan di press menggunakan *handpress*. Pellet yang dihasilkan dikeluarkan dari *handpress*. Kemudian dianalisis dengan menggunakan FT-IR dengan tipe Shimadzu 8400S. Spektrum FTIR discan pada panjang gelombang 400 - 4000 cm^{-1} .

3.5.4.2 Karakterisasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

Diambil beberapa butir kristal benzimidazol dilarutkan dalam etanol p.a. Larutan benzimidazol dimasukkan di dalam kuvet. Selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *double beam* tipe Shimadzu 1600 series. Scanning spektrum UV-Vis dilakukan setelah prosedur baseline selesai dan dibuat spektrumnya pada panjang gelombang 200 nm-400 nm.

3.5.4.3 Karakterisasi dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM)

Ditimbang sebanyak 0,05 g kristal benzimidazol dilarutkan dalam 2 mL n-heksana p.a. Kemudian diinjeksikan sebanyak 0,2 μL menggunakan *syringe* pada instrumen KG-SM dengan tipe GC Agilent technologies Seri 7890B-MS Agilent technologies Seri 5977B. Dalam penelitian ini masing-masing sampel dibuat *total ionic chromatogram* (TIC) dan masing-masing puncak discan untuk menghasilkan spektra massa. Masing-masing puncak yang terdeteksi pada Kromatogram akan di analisis menggunakan spektra massa. Sehingga hasil akhir analisis didapatkan dan spektrum massa dari masing-masing komponen. Spesifikasi dan tipe alat KG-SM yang digunakan adalah sebagai berikut:

Injeksi	: GC-ALS
Tekanan	: 13,35 psi
Kecepatan aliran gas	: 54,087 mL/menit
Split ratio	: 50:1
Jenis kolom	: HP-5MS
Temperatur injeksi	: 200,00 °C
Laju	: 10°/menit

Awal : 150°, hold 1 menit
Akhir : 300°, hold 4 menit

3.5.5 Uji Aktivitas Antibakteri

3.5.5.1 Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri

Media *nutrient agar* steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5ml. Tabung reaksi diletakkan pada kemiringan 30-45 °C dan ditunggu hingga memadat. Kultur bakteri *S. aureus* diambil sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan secara zig-zag pada permukaan media dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 hari (24 jam) [42]. Pengulangan dilakukan pada kultur bakteri gram positif dan bakteri gram negatif lainnya.

3.5.5.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Nutrient broth yang sudah steril disiapkan dalam tabung reaksi. Bakteri dari media agar miring diambil sebanyak 1 ose, dicelupkan ke dalam media *nutrient broth* hingga tidak ada bakteri yang menempel pada jarum ose dan diinkubasi selama 1 hari (24 jam). Setelah itu, suspensi bakteri *S. aureus* dihitung dibawah mikroskop menggunakan *haemocytometer* hingga diperoleh jumlah koloni 10^5 - 10^8 CFU/ml [42]. Pengulangan dilakukan pada suspensi bakteri gram negatif.

3.5.5.3 Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Sumuran

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi sumuran. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan oleh zona bening yang terbentuk disekeliling sumuran pada media biakan bakteri. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan produk benzimidazol yang dilarutkan dalam etanol, etanol digunakan sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *S. aureus*. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan konsentrasi benzimidazol yang berbeda-beda (100, 300, dan 500 ppm) dan pengamatan dilakukan setelah waktu inkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Cawan petri yang sudah steril disiapkan dan media yang sudah steril dituangkan kedalam cawan petri secara aseptis dan ditunggu hingga memadat. Suspensi bakteri dimasukkan sebanyak 0,1 ml pada permukaan agar menggunakan mikropipet dan diratakan menggunakan *spreader*. Pembuatan sumuran dilakukan menggunakan coker bor sebanyak 5 lubang sumuran. Lubang sumuran diisi sebanyak 50

μL benzimidazol yang telah dilarutkan pada konsentrasi berbeda, kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-), kemudian di bungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan pengamatan dilanjutkan 48 jam. Zona bening yang terbentuk diamati sebagai luas zona hambat. Pengulangan dilakukan pada suspensi bakteri gram negatif lainnya, *S. typhi* dan EPEC.

3.5.5.4 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Penentuan MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimum senyawa antibakteri yang dapat menghambat mikroorganisme setelah 18 hingga 24 jam masa inkubasi. Uji MIC dilakukan dengan metode pengenceran agar. Sebanyak 1mL larutan uji dengan berbagai konsentrasi dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1mL suspensi bakteri secara aseptis menggunakan mikropipet pada setiap konsentrasi. Konsentrasi dibuat dengan variasi 3.12, 6.25, 12.5. 25 dan 50 μg /mL. Campuran media uji dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi menggunakan inkubator shaker pada temperatur ruang selama 18-24 jam. Seri pengenceran disiapkan dari campuran akuades dan media uji menjadi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} μg /mL. Media uji diambil sebanyak 100 μl dan dimasukkan pada cawan petri. Campuran dipadatkan menggunakan media agar padat dengan metode *pour plate* dan diinkubasi selama waktu 24 jam. Jumlah koloni yang timbul pada permukaan media agar padat dihitung dengan aturan SPC. Aktivitas antibakteri dari benzimidazol disajikan dengan nilai MIC atau kemampuan penghambatan yang dinyatakan dalam persentase. Nilai MIC diperoleh dengan menentukan konsentrasi yang menunjukkan penurunan jumlah bakteri uji sebanyak 90% [42].

3.5.6 Analisis Data

Persen yield hasil sintesis dihitung dengan menggunakan rumus seperti ditunjukkan dalam persamaan (1). Dalam persamaan tersebut, massa hasil sintesis diperoleh dari hasil pengukuran langsung massa kristal yang diperoleh dari hasil sintesis. Sedangkan massa teoritis diperoleh dari hasil perhitungan dalam **Lampiran B.1**.

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{massa hasil sintesis (g)}}{\text{massa teoritis (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

repository.ub.ac.id

Nilai luas area dari masing-masing puncak yang terdapat dalam *total ionic chromatogram* (TIC) digunakan untuk menghitung persen relatif masing-masing komponen, yaitu dengan membandingkan nilai luas areanya terhadap nilai luas area total.

Panjang gelombang maksimum dari spektrum UV-Vis masing-masing komponen digunakan untuk memperkirakan transisi elektronik yang dari senyawa dihasilkan. Sedangkan pita-pita yang terdapat dalam spektrum FTIR digunakan untuk memperkirakan jenis gugus fungsional senyawa hasil sintesis.

Aktivitas antibakteri dari benzimidazol hasil sintesis ditentukan dengan mengukur zona bening yang dihasilkan pada media tumbuh *nutrient agar*. Pengukuran zona hambat untuk setiap hasil uji dilakukan sebanyak tiga kali dengan posisi diagonal yang berbeda-beda. Sedangkan persen penghambatan dihitung dengan rumus berikut [40]:

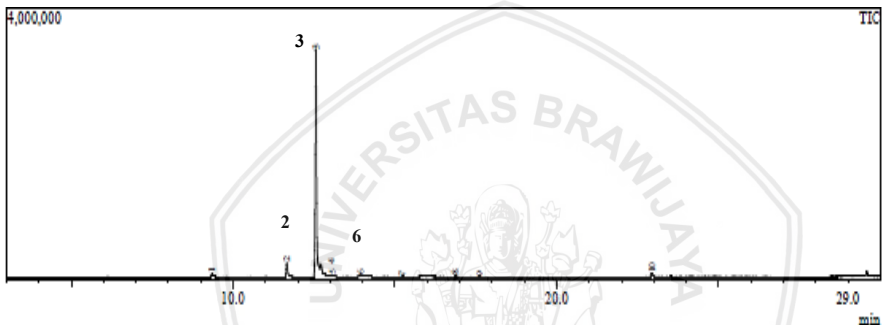
$$\% \text{ Penghambatan} = 100\% - \left(\frac{N_t}{N_o} \times 100\% \right) \quad (2)$$

Benzimidazol hasil sintesis dinyatakan aktif jika memiliki % penghambatan diatas 90%, N_o adalah jumlah bakteri awal dan N_t adalah jumlah bakteri akhir.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi komponen Minyak Jeruk Purut (MJP)

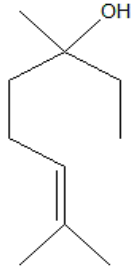
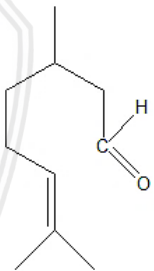
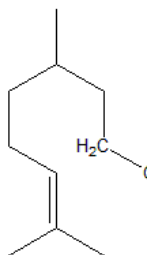
Minyak jeruk purut yang digunakan sebagai sumber bahan dasar dalam sintesis (kandungan sitronelal) merupakan minyak jeruk purut yang diperoleh dari hasil penyulingan campuran ranting dan daun jeruk purut (milik Institut Atsiri). Kadar sitronelal dalam minyak jeruk purut ditentukan berdasarkan data *total ionic chromatogram* (TIC) seperti yang ditunjukkan dalam **Gambar 4.1** yang dikombinasikan dengan data MS yang terdapat dalam **Lampiran C.2**.



Gambar 4.1 Kromatogram Minyak Jeruk Purut

Berdasarkan kromatogram **Gambar 4.1** tampak bahwa MJP yang berasal dari campuran hasil penyulingan daun dan ranting terdeteksi 10 puncak (komponen). Komponen utama dalam MJP dengan kadar $> 2\%$ ada 3 puncak (komponen) yaitu sitronelal (83,88 %), linalool (6,98 %), dan β -sitronelol (2,03 %) seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

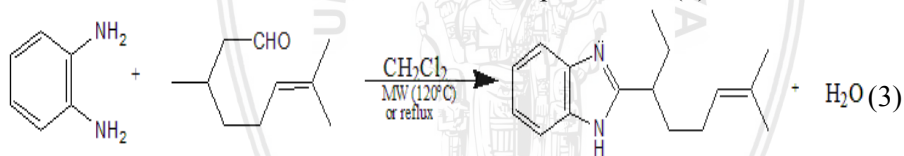
Tabel 4.1 Tabulasi hasil identifikasi KG-SM Komponen Utama MJP

Puncak	Waktu Retensi	Pola Fragmentasi (m/z)	% Relatif	Similarity Indeks (SI)	Struktur
2	11.66	136, 121, 107, 93, 71 (base peak), 69, 55, 41, 40	6.98	95	 <p>Linalool</p>
3	12.56	154, 139, 121, 111, 95, 83, 69, 55, 41 (base peak) 154, 140, 136, 121, 111, 95, 70, 69, 55, 41 (base peak)	83.88	95	 <p>Sitronelal</p>
6	13.94	95, 81, 69, 55, 41 (base peak) 156, 138, 123, 109, 95, 81, 69, 55, 41 (base peak)	2.03	84	 <p>β-Sitronelol</p>

Pada **Tabel 4.1** menunjukkan hasil analisis komponen utama pada minyak jeruk purut dari daun dan ranting jeruk purut adalah sitronelal, linalool, dan β -sitronelol, dimana semua komponen merupakan senyawa monoterpen teroksigenasi. Adanya pola fragmentasi senyawa-senyawa yang dianalisis dari minyak jeruk purut dibandingkan terhadap pola fragmentasi terhadap senyawa-senyawa yang ada di *library*. Maka dapat dikatakan bahwa komponen dengan waktu retensi 11,66 menit merupakan komponen linalool dengan nilai *similarity indeks* 95. Sementara untuk sitronelal dijumpai pada waktu retensi 12,56 menit terhadap pola fragmentasi yang ada pada *library* dengan nilai SI 95. Demikian juga untuk komponen dengan waktu retensi 13,94 menit merupakan komponen β -sitronelol dengan nilai SI 84. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa komponen puncak 2, 3, 6 berturut-turut merupakan senyawa linalool, sitronelal dan β -sitronelol.

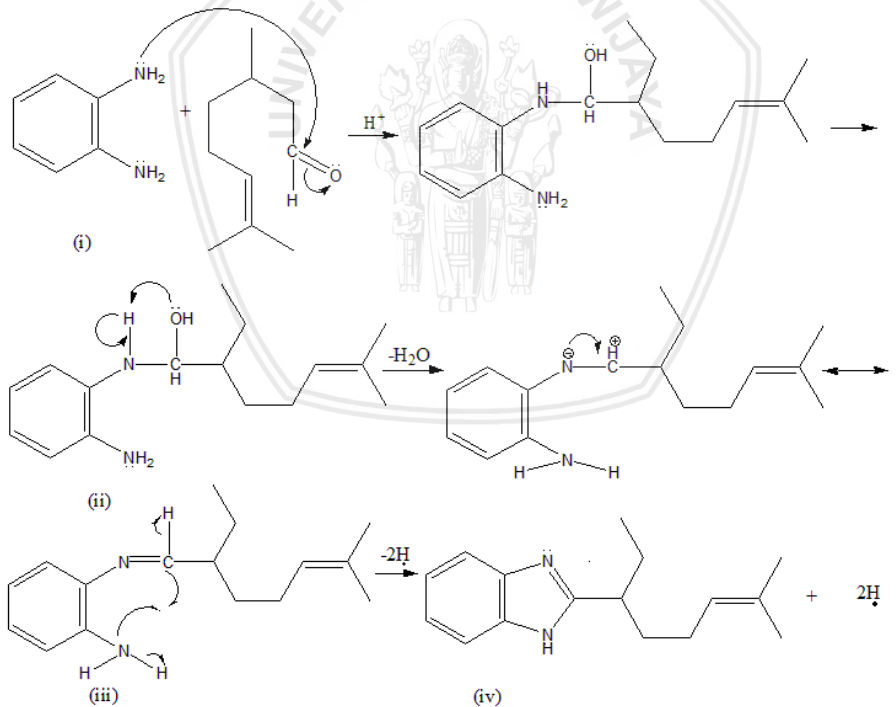
4.2 Sintesis senyawa turunan benzimidazol dari sitronelal dalam minyak jeruk purut menggunakan metode refluks dan *microwave*

Senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis dari sitronelal dan 1,2-fenildiamin secara skematis dituliskan dalam persamaan (3):



Nampak bahwa reaksi tersebut digolongkan dalam reaksi kondensasi yang disertai dengan pelepasan molekul air. Senyawa turunan benzimidazol terbentuk dari gugus aldehid yang berasal dari minyak jeruk purut dan amina primer dari 1,2-fenildiamin. Pasangan elektron bebas dari gugus amina berperan sebagai nukleofil yang menyerang gugus karbonil dari sitronelal dan akan dihasilkan senyawa turunan benzimidazol. Beberapa peneliti dalam sintesis turunan benzimidazol menggunakan katalis, sedangkan dalam penelitian ini tanpa ditambahkan katalis. Peranan katalis dilakukan oleh komponen-komponen lain selain sitronelal yang bersifat asam yang terdapat dalam minyak jeruk purut.

Secara mekanisme, kedua molekul di sintesis melalui reaksi kondensasi. Terbentuknya senyawa turunan benzimidazol melalui beberapa tahap reaksi. Pada tahap (i) bergabungnya reaktan 1,2-fenildiamin sebagai penyedia pasangan elektron bebas dari gugus amina dengan molekul sitronelal yang memiliki gugus aldehid. Terbentuknya molekul yang lebih besar berkondensasi mengakibatkan terjadinya pelepasan molekul air (ii). Pada tahap (iii) terjadi pelepasan dua molekul hidrogen melalui radikal disertai pembentukan ikatan rangkap C=N terbuka. Tahap terakhir adalah terjadinya siklisasi antara C radikal dan NH radikal menghasilkan cincin imidazol dan dua molekul radikal hidrogen. Beberapa penelitian sebelumnya menjelaskan pelepasan radikal ini dipercepat dengan penambahan katalis atau zat pengoksidasi tertentu. Sementara dalam penelitian ini proses radikal dipercepat dengan adanya radiasi gelombang mikro yang berasal dari reaksi menggunakan bantuan *microwave*. Mekanisme reaksi secara skematis ditunjukkan dalam **Gambar 4.2**



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi sintesis senyawa turunan benzimidazol

Proses sintesis dengan bantuan *microwave* baik dilakukan menggunakan pelarut yang mampu menyerap energi dari gelombang mikro, biasanya senyawa polar. Namun pada penelitian digunakan pelarut diklorometan yang bersifat kurang polar. Secara visual hasil sintesis yang dilakukan dengan menggunakan bantuan *microwave*, sebelum dilakukan pendinginan nampak titik-titik kristal mulai terbentuk sedangkan pada metode refluks titik-titik kristal tersebut belum nampak. Meskipun setelah dimasukkan ke dalam *freezer* selama 24 jam kedua kristal tersebut memiliki wujud kristal yang sama namun dengan jumlah kristal dengan bantuan *microwave* lebih banyak. Sedangkan pada penyaringan awal kristal benzimidazol nampak kristal berwarna kekuningan yang menggambarkan bahwa kristal benzimidazol masih tercampur dengan reaktan-reaktan yang ada, baik berasal dari minyak jeruk purut maupun padatan 1,2-fenildiamin yang juga berwarna kekuningan. Pencucian dengan diklorometan melarutkan komponen-komponen tersebut dan kristal berubah menjadi warna putih. Hal ini menunjukkan kemurnian dari produk hasil sintesis yang cukup tinggi.

4.3 Penentuan waktu optimum senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis menggunakan metode refluks dan bantuan *microwave*

Proses reaksi dilakukan dengan variasi waktu untuk mengetahui randemen tertinggi terbentuknya produk. Proses sintesis akan lebih efisien apabila waktu terpendek untuk memperoleh randemen tertinggi diketahui. Hasil padatan selanjutnya dikarakterisasi menggunakan UV-Vis, FT-IR dan KG-SM. Massa produk dan % yield (perhitungan massa teoritis pada **Lampiran B.1**) sintesis turunan benzimidazol ditampilkan dalam **Tabel 4.2** dan **Tabel 4.3**

Tabel 4.2 Tabulasi hasil sintesis benzimidazol menggunakan metode refluks

Pelarut yang digunakan	Lama reaksi (jam)	Ratio MJP:1,2-fenildiamin	Hasil	
			Massa (g)	% yield
Diklorometan (CH ₂ Cl ₂)	4	2:1	0.15	8.87%
	6	2:1	0.16	9.47 %
	8	2:1	0.18	10.65 %
	10	2:1	0.13	7.69 %
	12	2:1	0.13	7.69 %

Tabel 4.3 Tabulasi hasil sintesis benzimidazol menggunakan metode *microwave*

Pelarut yang digunakan	Lama reaksi (menit)	Ratio MJP:1,2-fenildiamin	Hasil	
			Massa (g)	% yield
Diklorometan (CH ₂ Cl ₂)	30	2:1	0.14	8.28 %
	40	2:1	0.21	12.43 %
	50	2:1	0.24	14.20 %
	60	2:1	0.30	17.75 %
	70	2:1	0.23	13.61 %

Berdasarkan massa dan % yield dari hasil sintesis diperoleh waktu optimum pemanasan refluks selama 8 jam. Hal ini dapat dilihat dari massa pada hasil sintesis menggunakan refluks selama 8 jam diperoleh massa produk sebesar 0.18 g (10.65%). Sedangkan pemanasan dengan bantuan *microwave* optimum selama 60 menit. Apabila dibandingkan dari massa

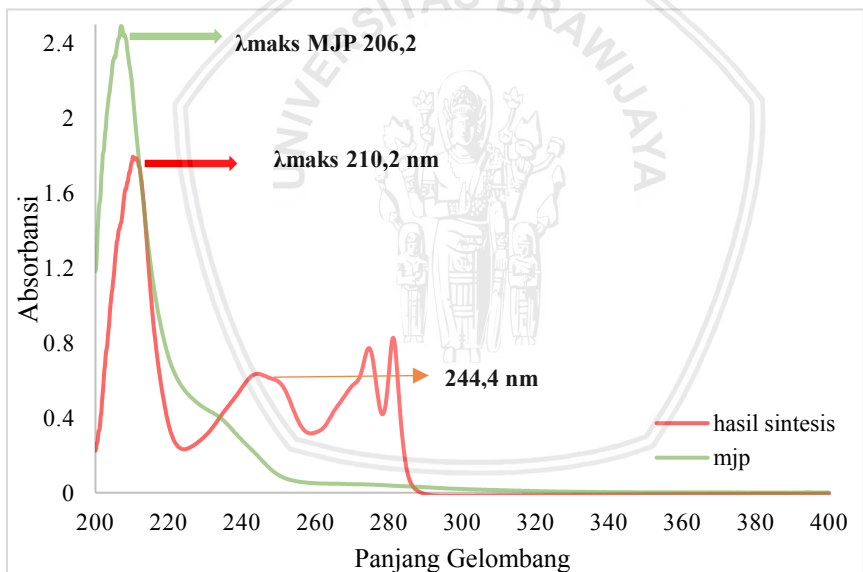
pada hasil sintesis menggunakan *microwave* pada variasi waktu lainnya, pemanasan selama 60 menit menghasilkan massa produk paling tinggi yaitu sebesar 0.30 g (17.75%). Dari kedua metode tersebut dapat disimpulkan bahwa metode sintesis yang paling efisien adalah menggunakan bantuan *microwave*. Hal ini dibuktikan dengan membandingkan massa hasil sintesis menggunakan *microwave* dan refluks dengan variasi waktu reaksi yang berbeda. Hal ini disebabkan pada waktu yang sama, pemanasan reaksi menggunakan refluks belum menghasilkan padatan benzimidazol yang diinginkan. Proses sintesis metode konvensional menggunakan refluks diperoleh massa tertinggi pada waktu reaksi 8 jam, tetapi hasil tersebut masih lebih sedikit jika dibandingkan dengan bantuan *microwave* selama 60 menit. Hasil ini telah sesuai dengan teori yang ada, menurut Lew, dkk [28] proses sintesis dengan bantuan *microwave* merupakan metode sintesis yang lebih menguntungkan dari pada metode konvensional dikarenakan pemanasan dengan *microwave* tidak hanya mempercepat laju reaksi organik tetapi juga dapat meningkatkan hasil produk.

Pada metode *microwave*, massa hasil sintesis mengalami kenaikan setiap 10 menit hingga pemanasan dengan waktu 60 menit diperoleh massa sebesar 0.30 g. Hal tersebut dikarenakan pada waktu reaksi 60 menit adalah waktu yang optimal untuk sintesis senyawa dengan memaksimalkan absorpsi panas *microwave* pada molekul-molekul senyawa, sehingga kemungkinan tumbukan antar molekul semakin besar dan berakibat pada banyaknya senyawa target yang terbentuk. Sintesis senyawa dalam kondisi waktu reaksi optimum ditandai dengan perolehan hasil rendemen tertinggi. Produk hasil sintesis yang direaksikan kurang dari waktu optimum yaitu 30-50 menit memiliki hasil randemen yang lebih rendah, diduga dapat disebabkan absorpsi panas *microwave* oleh molekul-molekul senyawa belum berjalan maksimal sehingga tumbukan antar molekul belum berjalan maksimal pula. Sedangkan penambahan waktu reaksi melebihi waktu reaksi optimum yaitu 70 menit akan menyebabkan panas yang memapar senyawa lebih lama, akibatnya senyawa mengalami dekomposisi yang berdampak pada penurunan hasil rendemen yang diperoleh.

4.4 Karakterisasi produk hasil sintesis

4.4.1 Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Visible digunakan untuk mengidentifikasi serapan suatu senyawa dengan mempelajari transisi elektronik suatu molekul diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut. Oleh karena itu serapan cahaya oleh sampel dalam spektrum UV tergantung pada struktur elektronik senyawa tersebut. Karakterisasi spektrofotometer UV-Vis menunjukkan hubungan panjang gelombang dalam nanometer dengan besarnya absorbansi larutan yang diuji. Karakterisasi UV-Vis dilakukan secara kualitatif dengan membandingkan spektra bahan utama dan hasil sintesis untuk mengetahui perubahan panjang gelombang bahan utama dan pada hasil sintesis (**Gambar 4.4**). Scanning spektrum UV-Vis dilakukan setelah prosedur baseline selesai dan dibuat spektrumnya pada panjang gelombang 200 nm-400 nm.



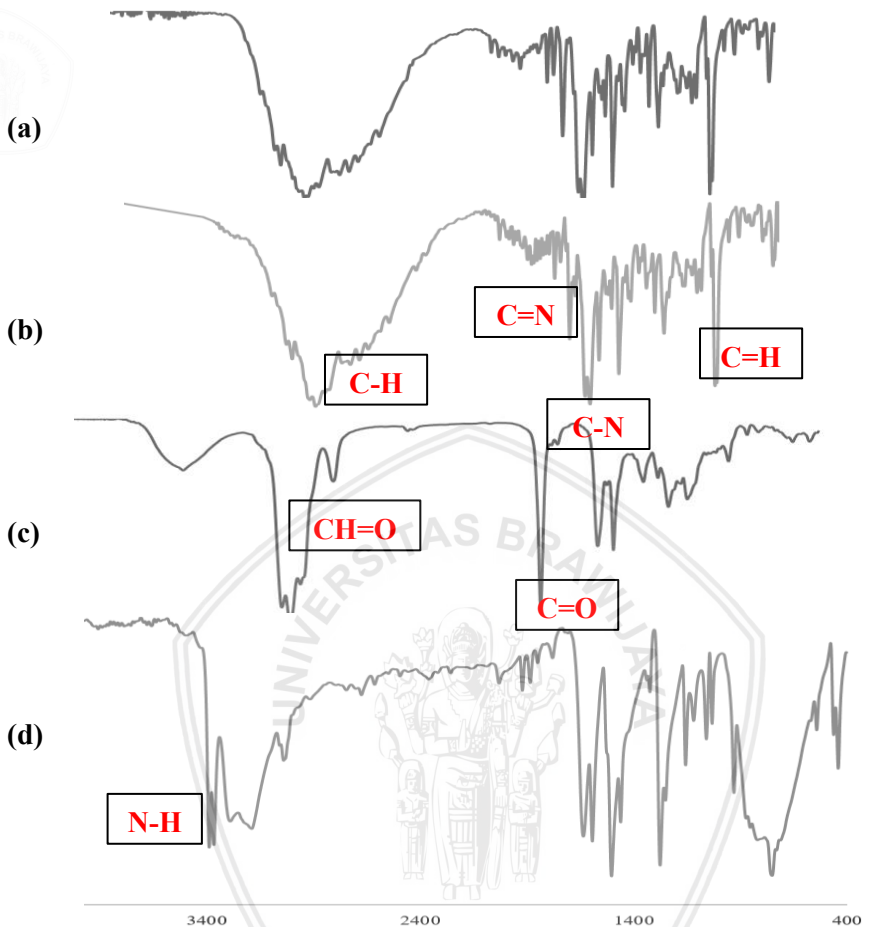
Gambar 4.3 Spektra produk bahan utama MJP dan produk hasil sintesis dengan bantuan *microwave*

Spektra spektrofotometer UV-VIS hasil sintesis senyawa turunan benzimidazol dibandingkan dengan spektra bahan utama minyak jeruk

purut. Berdasarkan **Gambar 4.3** dari produk benzimidazol hasil sintesis dengan bantuan *microwave* yang dilarutkan dalam etanol, terdapat konfirmasi struktur dengan menggunakan spektrum UV terbentuk beberapa puncak absorpsi (λ_{maks}). Hasil spektrum UV-Vis minyak jeruk purut memiliki satu pita serapan maksimum pada panjang gelombang 206,2 nm yang merupakan transisi ikatan (C=C). Sedangkan senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis memiliki pita serapan pada panjang gelombang 210,2 nm. Adanya pergeseran panjang gelombang yang lebih panjang (efek batokromik) tersebut dihasilkan oleh terbentuknya kromofor baru pada senyawa hasil reaksi. Sedangkan serapan yang khas terjadi pada panjang gelombang 244,4 nm yang berasal dari sistem aromatik (benzena) atau terdapatnya pita B yang diduga akibat terjadinya transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$. Selain itu senyawa turunan benzimidazol hasil reaksi memiliki dua pita serapan maksimum 274,6 nm dan 281 nm. Munculnya dua pita serapan ini diduga berasal dari transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dari sistem benzimidazoid (C=N). Puncak pada panjang gelombang maksimum 281 nm menunjukkan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang (efek batokromik). Pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang kemungkinan disebabkan oleh delokalisasi elektron π^* dalam molekul karena adanya konjugasi elektron yang dapat menyebabkan elektron dapat berpindah tempat dalam molekul yang mengandung sistem aromatik. Spektra spektrofotometer UV-Vis produk hasil sintesis dengan metode refluks juga menunjukkan pita-pita serapan yang serupa.

4.4.2 Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Spektrofotometer FTIR

Hasil sintesis turunan benzimidazol dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer inframerah untuk mengetahui adanya gugus yang hilang pada bahan utama dan munculnya gugus baru pada hasil reaksi. Karakterisasi hasil sintesis dilakukan pada daerah serapan bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Perbandingan spektra spektrofotometer IR hasil sintesis dengan bahan utama ditunjukkan pada **Gambar 4.4**. Sedangkan hasil sepektra FT-IR masing-masing hasil sintesis dan bahan utama disajikan pada **Lampiran E**.



Gambar 4.4 Spektra FT-IR (a) turunan benzimidazol hasil sintesis metode refluks, (b) turunan benzimidazol hasil sintesis menggunakan bantuan *microwave*, (c) MJP dan (d) 1,2-fenildiamin

Spektra IR tersebut merupakan spektra senyawa turunan benzimidazol hasil sintesis dengan bantuan *microwave*. Berikut merupakan hasil analisis gugus fungsi dari spektra FT-IR bahan utama yaitu MJP, 1,2-fenildiamin, produk hasil sintesis menggunakan bantuan *microwave* dan metode refluks yang diperoleh ditampilkan dalam **Tabel 4.4**.

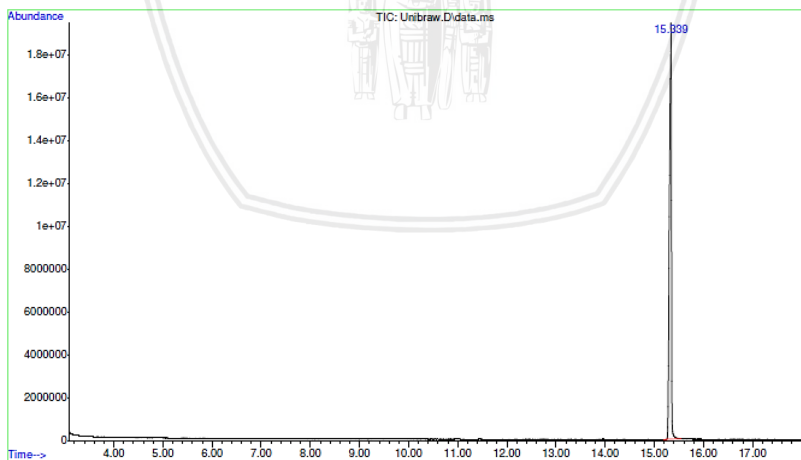
Tabel 4.4 Tabulasi puncak serapan bilangan gelombang bahan utama dan hasil sintesis

Gugus	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)			
	Turunan benzimidazol		MJP	1,2-fenildiamin
	Metode Refluks	Bantuan <i>microwave</i>		
N-H	3177,30	3200,45	-	3387,53-3186,95
C-H sp³	(2924,65) (1427,99- 1379,77)	(2955,51) (1454,99- 1341,20)	(2963,22- 2922,72) (1454,99- 1379,77)	(1458,85)
C-H sp²	(3051,94) (936,17- 671,94)	(3051,94) (913,03- 671,94)	(830,1- 687,37)	(3038,44) (926,46-710,52)
C=C aromatik	(1588,07- 1539,85)	(1590- 1508,99)	-	(1634,36- 1501,28)
C=C	1622,79	1620,66	1645,93	-
C=N	1638,21	1636,29	-	-
C-N	(1310,34- 1206,19)	(1310,34- 1206,19)	-	(1321,91- 1248,62)
O-H	-	-	3433,82	-
CH=O	-	-	(2874,50- 2716,35)	-
C=O	-	-	1726,93	-

Berdasarkan **Gambar 4.4** dan **Tabel 4.4** hasil sintesis benzimidazol dari minyak jeruk purut dan 1,2-fenildiamin dengan bantuan *microwave* dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR menunjukkan serapan-serapan gugus fungsi yang terbentuk, gugus C=N ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $1636,29\text{ cm}^{-1}$, N-H stretching pada daerah $3200,45\text{ cm}^{-1}$, C-N pada bilangan gelombang $1310,34\text{--}1206,19\text{ cm}^{-1}$, C=C cincin aromatik pada bilangan gelombang $1590\text{--}1508,99\text{ cm}^{-1}$, dan C=C stretching alkena pada $1620,66\text{ cm}^{-1}$ merupakan kelompok gugus fungsional yang terdapat pada benzimidazol serta serapan C-H sp^2 yang terdapat pada daerah $3051,94\text{ cm}^{-1}$ juga muncul pada bahan utama minyak jeruk purut dan 1,2-fenildiamin. Sedangkan serapan CH=O di daerah $2874,50\text{--}2716,35\text{ cm}^{-1}$, O-H pada daerah $3433,82\text{ cm}^{-1}$ dan C=O $1726,93\text{ cm}^{-1}$ yang ada pada bahan utama minyak jeruk purut tidak muncul di serapan hasil sintesis. Hal ini menunjukkan bahwa produk hasil sintesis adalah senyawa turunan benzimidazol.

4.4.3 Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa

Berdasarkan hasil sintesis senyawa turunan benzimidazol dilakukan identifikasi menggunakan Kromatografi Gas diperoleh kromatogram yang ditunjukkan **Gambar 4.5**.



Gambar 4.5 Kromatogram senyawa hasil sintesis dengan *microwave* (t: 60 menit)

Analisis hasil sintesis senyawa turunan benzimidazol menggunakan KG-SM diperoleh kromatogram **Gambar 4.5** dengan spektra massa dalam **Lampiran C.3**. Dapat diketahui hasil sintesis sitronelal dalam MJP dengan 1,2-fenildiamin terdapat satu puncak pada waktu retensi 15,34 menit yang menunjukkan keberadaan senyawa hasil sintesis turunan benzimidazole dengan $m/z = 242$ yang merupakan puncak ion molekuler yang dihasilkan dari terbentuknya senyawa turunan benzimidazol seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 4.5**

Tabel 4.5 Tabulasi hasil identifikasi KG-SM senyawa hasil sintesis

Puncak	Waktu Retensi	Pola Fragmentasi (m/z)
1	15.34	242.2, 227.1, 199.1, 173.1, 159, 145.1 (base peak), 130, 104.1, 77.1, 55.1

Berdasarkan spektra massa, m/z yang muncul dengan 5 peak tertinggi pada m/z 242.2, 227.1, 159, 130, dan 145 (sebagai base peak). Mekanisme fragmentasi dengan peak tertinggi yang ditunjukkan pada **Lampiran F.2**.

4.5 Uji Aktivitas Antibakteri

4.5.1 Penentuan Zona Hambat Benzimidazol

Penentuan zona hambat dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan oleh zona bening yang terbentuk disekeliling sumuran pada media biakan bakteri. Zona bening yang terbentuk disajikan seperti pada **Gambar 4.6**. Diameter zona hambat yang teramati diukur menggunakan penggaris.



Gambar 4.6 Zona hambat yang terbentuk pada larutan uji benzimidazol berbagai media biakan bakteri

Berdasarkan hasil penelitian bahwa semua benzimidazol memiliki aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat berupa zona bening di sekeliling sumuran media. Pada **Tabel 4.6** disajikan zona hambat yang terukur memiliki diameter yang berbeda-beda pada masing-masing larutan uji benzimidazol.

Tabel 4.6 Diameter zona hambat benzimidazol

Sampel	Biakan bakteri	Jumlah sel bakteri (CFU/mL)	Konsentrasi (µg/mL)	Pengukuran (mm)	
				24 jam	48 jam
B1	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	5.43x10 ⁷	100	12	10.3
			300	14.3	9
			500	11	6.7
B1	Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	5.9x10 ⁶	100	10	9.7
			300	6.3	8
			500	16.7	14
B1	Bakteri EPEC (<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>)	6.72x10 ⁷	100	13.3	14.7
			300	15.7	15.3
			500	13.7	12.7

Berdasarkan **Tabel 4.6** menunjukkan bahwa lama waktu inkubasi selama 24 jam dan 48 jam dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Diameter zona hambat benzimidazol paling besar ditunjukkan dalam menghambat pertumbuhan bakteri EPEC. Selanjutnya zona hambat benzimidazol cukup besar ditunjukkan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan zona hambat yang paling kecil ditunjukkan dalam menghambat bakteri *S. typhi*. Konsentrasi optimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan EPEC pada konsentrasi benzimidazol 300 mg/L di dalam etanol dengan zona hambat berurut-turut 14.3 mm dan 15.7 mm. Sedangkan konsentrasi optimum dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi benzimidazol 500 mg/L dengan zona hambat sebesar 16.7 mm. Sehingga dapat disimpulkan benzimidazol hasil sintesis memberikan daya hambat yang kuat karena

repository.ub.ac.id

zona hambat yang terbentuk memiliki diameter 10 – 16.7 mm. Hal ini sesuai dengan Davis and Stout [43] mengenai kriteria daya hambat yang memiliki diameter zona hambat >20 mm (sangat kuat), 10-20 mm (kuat), 5-10 mm (sedang) dan <5 mm (lemah). Begitu juga saat waktu inkubasi 48 jam menunjukkan aktivitas benzimidazol tidak berbeda nyata.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri metode difusi sumuran dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis media yang digunakan, jumlah inokulum bakteri, sifat mikrobial dan kelarutan senyawa uji [44]. Jenis media mempengaruhi kemampuan tumbuh dari mikroba uji yaitu faktor sterilitas dan fertilitas media. Jumlah inokulum berkaitan dengan kepadatan sel bakteri dalam suspensi sel yang digunakan. Sifat mikroba berkaitan dengan morfologis dan fisiologis mikroba yang dipengaruhi oleh gen tersebut. Kelarutan senyawa uji meliputi kemampuan untuk terdifusi ke dalam media agar, hal ini berhubungan dengan polaritas senyawa uji. Benzimidazol sulit larut dalam air sehingga untuk dapat berpotensi sebagai anti bakteri maka digunakan pelarut yang sesuai yaitu etanol.

4.5.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Benzimidazol

Penentuan MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimum senyawa antibakteri yang dapat menghambat mikroorganisme setelah 18 hingga 24 jam masa inkubasi. Metode yang digunakan merupakan metode dilusi pengenceran agar. Konsentrasi larutan yang digunakan dalam uji ini mengacu pada hasil uji sebelumnya. Sebagai perlakuan, digunakan konsentrasi larutan uji, yaitu 0.78; 1.56; 3.12; 6.25; 12.5; 25; dan 50 µg/mL. Kontrol yang digunakan pada dilusi padat adalah kontrol sterilitas media, kontrol pertumbuhan bakteri uji dan kontrol negatif (kontrol pelarut).

Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol menunjukkan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dengan persen penghambatan di atas 90% dengan lama waktu inkubasi 24 jam pada suhu 37°C terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* (**Tabel 4.7**) bakteri *S. typhi* (**Tabel 4.8**), dan bakteri EPEC (**Tabel 4.9**)

Tabel 4.7 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Sampel	Jumlah sel bakteri awal (CFU/mL)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah bakteri akhir (sel/mL)	Persen Penghambatan %
Benzimidazol	1.295x10 ⁷	3.12	1.1 x10 ⁴	99.943
		6.25	1.07 x10 ⁴	99.917
		12.5	1.16 x10 ⁴	99.911
		25	1.7 x10 ⁴	99.869
		50	2.02 x10 ⁴	99.844

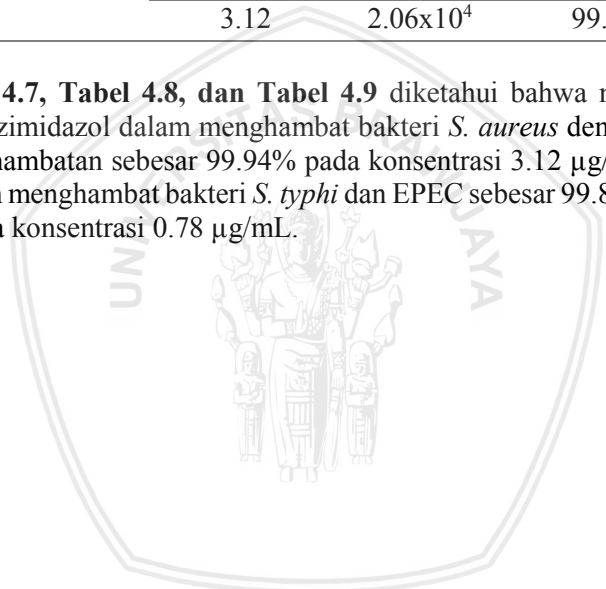
Tabel 4.8 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

Sampel	Jumlah sel bakteri awal (CFU/mL)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah bakteri akhir (sel/mL)	Persen Penghambatan %
Benzimidazol	1.67x10 ⁷	0.78	2.32x10 ⁴	99.861
		1.56	2.45x10 ⁴	99.853
		3.12	2.23x10 ⁴	99.866

Tabel 4.9 Hasil uji konsentrasi hambat minimum larutan benzimidazol inkubasi 24 jam terhadap pertumbuhan bakteri EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*)

Sampel	Jumlah sel bakteri awal (CFU/mL)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah bakteri akhir (sel/mL)	Persen Penghambatan %
Benzimidazol	1.94×10^7	0.78	2.54×10^5	99.987
		1.56	9.5×10^4	99.995
		3.12	2.06×10^4	99.894

Pada **Tabel 4.7**, **Tabel 4.8**, dan **Tabel 4.9** diketahui bahwa nilai KHM untuk benzimidazol dalam menghambat bakteri *S. aureus* dengan persentase penghambatan sebesar 99.94% pada konsentrasi 3.12 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan dalam menghambat bakteri *S. typhi* dan EPEC sebesar 99.86% dan 99.98% pada konsentrasi 0.78 $\mu\text{g/mL}$.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Sintesis senyawa turunan benzimidazol lebih efektif dilakukan dengan menggunakan bantuan *microwave*.
2. Waktu optimum dalam sintesis turunan benzimidazol dengan metode refluks selama 8 jam dan menggunakan bantuan *microwave* selama 60 menit.
3. Senyawa turunan benzimidazol memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *S. typhi* dan EPEC dengan diameter zona hambat sebesar 10 mm - 16.7 mm yang termasuk ke dalam daya hambat kuat. Selain itu, benzimidazol dapat menghambat bakteri *S. aureus* dengan persentase penghambatan sebesar 99.94% pada konsentrasi 3.12 $\mu\text{g/mL}$ serta menghambat bakteri *S. typhi* dan EPEC sebesar 99.86% dan 99.98% pada konsentrasi 0.78 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan sintesis turunan benzimidazol menggunakan katalis dan digunakan perbandingan mol yang berbeda, sehingga diketahui pengaruh penambahan reaktan yang digunakan. Serta dalam uji MIC dilakukan pengujian dalam konsentrasi larutan uji yang lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bandyopadhyay, Prabal, S. Manisha, G.K. Prasad, S. Pratibha, M.P. Kaushik, 2011, **Mesoporous mixed metal oxide nanocrystals: Efficient and recyclable heterogeneous catalysts for the synthesis of 1,2 disubstituted benzimidazols and 2-substituted benzothiazoles**, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, No. 341, pp. 77-82.
- [2] Saberi, A 2015, **Efficient synthesis of Benzimidazols using zeolite, alumina and silica gel under microwave irradiation**, *Iranian Journal of Science & Technology*, Vol. 1(39), pp. 7-10.
- [3] Suzana, Melanny, Ika S., Kholis Amalia N., J. Ekowati, Marcelino Rudyanto, H. Poerwono, T. Budiati, 2013, **Pengaruh Gugus Metoksi Posisi Orto (o) dan Para (p) Pada Benzaldehida Terhadap Sintesis Turunan Khalkon dengan Metode Kondensasi Aldol**, *Jurnal Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, Vol.2(1).
- [4] Munawaroh, S dan P. Astuti, 2010, **Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana**, *Jurnal Kompetensi Tek.* Vol. 2, No. 1, pp. 73–78.
- [5] Prabawati, S. Yunita, A. Khusnuryani, Khamidinal, 2017, **Sintesis Senyawa Calkon Bebas Pelarut Sebagai Zat Antibakteri**, *Jurnal Alchemy Penelitian Kimia*, Vol. 13, No. 1, pp. 95-102.
- [6] Lenardao, Eder. J, Giancarlo, V. Botteselle, Fransisco de Azambuja, Gelson, Perin and Raquel, G. Jacob, 2007, **Citronellal as key compound in organic synthesis**, *Journal Tetrahedron*, Vol. 63, No. 803, pp. 6671-6711.
- [7] Kankeaw, Uthumporn, R. Rawanna, 2015, **The Study of Antibacterial Activity of Benzimidazol Derivative Synthesized from Citronellal**, *International Journal of Bioscience, Biochemistry, and Bioinformatics*, Vol. 5, No. 5, pp. 280-287.

- repository.ub.ac.id
- [8] Yunita, Isti, 2013, **Kajian Sintesis, Karakterisasi dan Modifikasi MCM-41**, *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Universitas Negeri Yogyakarta.
- [9] Wadhawa, Gurumeet C, Vitthal S. Shivankar, Dinanath D. Patil, Yashwant A. Gaikwad¹, Laxman V. Gavali¹ and Chransingh H. Gill, 2016, **Review on Synthesis of Benzimidazharaole Using Green Protocol**, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5, No. 9, pp. 624-656.
- [10] Safitri, N. Diah, 2014, **The Effect of NaOH Concentration on Benzylidenecyclohexanone Synthesis by Microwave Assisted Organic (MAOS) Method**, *Skripsi*, Universitas Negeri Yogyakarta.
- [11] Kuzmanovic S, Cvetkovic D, Barna D, 2009, **QSAR Analysis of 2-Amino or 2-Methyl-1-Substituted Benzimidazols Against Pseudomonas aeruginosa**, *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 1670-1682.
- [12] Perumal, S. Mariappan, and S. Selvaraj, 2004, **Benzimidazol Synthesis by Using Boron Sulfonic Acid as A New and Efficient Catalyst at Room Temperature**, *International Journal of ChemTech Research*, Vol. 5, No. 4, pp. 46.
- [13] Kidwai, Mazaahir, Anwar, Jahan, and Divya, Bhatnagar, 2010, **Polyethylene glycol: A recyclable solvent system for the synthesis of benzimidazol derivatives using CAN as catalyst**, *Journal Chemistry Science*, Vo. 122, No. 4, pp. 607-612.
- [14] Rahul R. Nagawade, Devanand B. Shinde, 2007, **TiCl₄ promoted synthesis of benzimidazol derivatives**, *Indian J. Chem.* Vol. 46B, pp. 349-351.
- [15] Rahul R. Nagawade, Devanand B. Shinde, 2006, **BF₃·OEt₂ promoted solvent-free synthesis of benzimidazol derivatives**, *Chinese Chem Lett*, Vol. 17, No. 4, pp. 453-456.
- [16] Fauzi'ah, Lina, T. D. Wahyuningsih, 2007, **Synthesis of Chalcones Substituted with Nitro and Hydroxyl Group in Alkaline Medium**, *Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA*, pp. 103-114.

- [17] Park, Sehyun, J. Jung, E.U. Cho, 2014, **Visible-Light-Promoted Synthesis of Benzimidazoles**, *Europee Journal of Organic Chemistry*, pp 4148-4154.
- [18] Azarifar, Davood, M. Pirhayati, B. Maleki, M. Sanginabadi, R. N. Yami, 2010, **Acetic acid-promoted condensation of *o*-lene diamine with aldehydes into 2-aryl-1-(arylmethyl)-1H-benzimidazoles under microwave irradiation**, *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol 75 (9), pp 1181-1189.
- [19] Demirayak, S, A.C. Karaburun, I. Kayagil, U. Ucucu, R. Beis, 2005, **Synthesis and Analgesic Activities of Some 2-(Benzazolylacetyl)amino-3-ethoxycarbonylthiophene Derivatives**, *Phosphorous Sulfur Silicon*, pp. 1841–1848.
- [20] Kumar, K. Awasthi, D. Lee, S.Y. Cummings, J.E. Knudson, S.E. Slayden, R.A. Ojima, I, 2013, **Benzimidazol-based antibacterial agents against Francisella tularensis**. *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 21, pp. 3318–3326.
- [21] Lezcano, M, W. Al-Soufi, M. Novo, E. Rodriguez-Nunez, J.V. Tato, 2002, **Complexation of Several Benzimidazole-Type Fungicides with α - and β -Cyclodextrins**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, pp. 108-112.
- [22] Fatmah A. S. Alasmary, Anna M. Snelling, Mohammed E. Zain, Ahmed M. Alafeefy, Amani S. Awaad and Nazira Karodia, 2015, **Synthesis and Evaluation of Selected Benzimidazol Derivatives as Potential Antimicrobial Agents**, *Journal Molecules*, Vol. 20, pp. 15206-15223.
- [23] Carcanague, D, Y.-K. Shue, M.A. Wuonola, M. Uria- Nickelsen, C. Joubran, J.K. Abedi, J. Jones, T.C. Kuehler, 2002, **Novel Structures Derived from 2-[[2-Pyridyl)methyl]thio]-1H-benzimidazole as Anti-Helicobacter pylori Agents**, *Journal of Medical Chemistry*, Vol. 45, pp. 4300–4309.
- [24] Singh, Harminder, Pal, Daizy R. Batishb, Shalinder Kaurb, Ravinder K. Kohlia, B, and Komal Arorab, 2005, **Phytotoxicity of the**

Volatile Monoterpene Citronellal against Some Weeds, *Centre for Environment and Vocational Studies*, Department of Botany, Panjab University, Chandigarh.

- [25] Suryaningrum, Sintha, 2016, **Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli***, Skripsi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [26] Luangnarumitchai, S, Lamlerthton and W. Tiyaboonchai, 2007, **Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Five Strains of *Propionibacterium acnes***, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 34, No. 1, pp. 60-64
- [27] Marwati, Tri dan Hermani, 2006, **Peningkatan Mutu Minyak Atsiri Melalui Proses Pemurnian**, *Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian*, Bogor.
- [28] Yuliani, R., Peni Indrayudha dan Septi Sriandita Rahmi, 2011, **Antibacterial Activity of Volatil Oil of Small Aromatic Lemon Leaves (*Citrus hystrix*) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***, *Journal of Pharmacon*, Vol. 12, No. 2, pp. 50-54.
- [29] Agustian, E., A. Sulaswatty, Tasrif, J.A. Laksmon, & B. Adilina, 2007, **Pemisahan Sitronelal dari Minyak Sereh Wangi Menggunakan Unit Fraksionasi Skala Bench**, *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, vol.17, No. 2, pp. 49-53.
- [30] Laksyani, N. P. L, Susanti, N.M.P, Widjaja, I. N. K, Rismayanti, A. A. M. I, dan Wirasuta IM.A. G, 2017, **Pengembangan Metode Refluks untuk Ekstraksi Andrografolid dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)**, Universitas Udayana.
- [31] Brown, R. A, 2005, **Modern Organic Chemistry**, *John Willey & Sons*, New York.
- [32] Jobson, Megan, 2014, **Energy Considerations in Distillation Chapter 6**, The University of Manchester, Manchester, UK.

- [33] Singh, Kalpana Virendra, 2015, **Microwave Assisted Synthesis, A Green Protocol for Development of New and Advanced Drug Delivery Systems, A Review**, *Social Issues and Environmental Problems*, Vol. 3, No. 9, pp. 1-4.
- [34] Lew, Amy, Peter O. Krutzik, Matthew E. Hart, and A. Richard Chamberlin, 2002, **Increasing Rates of Reaction: Microwave-Assisted Organic Synthesis for Combinatorial Chemistry**, *Journal of Combinatorial Chemistry*, Vol. 4, No. 2, pp. 95-105.
- [35] Kappe, C. O., Dallinger, D, 2006, **Microwave Assisted Organic Synthesis**, *National Drug Discovery Rev.*, Vol. 5, pp. 51.
- [36] Ardiansyah, 2007, **Antimikroba dari Tumbuhan**, *Tohoku University Sendai*, Jepang.
- [37] Brooks, G. F., Butel J. S., and Morse S. A., 2001, **Mikrobiologi Kedokteran**, *Salemba Medika*, Jakarta.
- [38] Afset J.E., Kare Bergh and Lars Bevanger, 2003, **High Prevalence of Atypical Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in Norwegian Children with Diarrhoea**, *Abstract Journal Medical Microbiology*, No.52, pp. 1015-1019.
- [39] Bonang, G. dan Koeswardono, E.S., 1982, **Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik Edisi I**, *PT. Gramedia*, Jakarta.
- [40] Salahuddin, M. Shaharyar, A. Mazumder, M. M. Abdullah, 2017, **Synthesis, characterization and antimicrobial activity of 1,3,4-oxadiazole bearing 1H-benzimidazole derivatives**. *Arabian Journal of Chemistry*, vol 10, pp 503-508
- [41] Ajani, Olayinka, O, D. V. Aderohunmu, S. J. Olorunshola, C. O. Ikpo, I. O. Olanrewaju, 2011, **Facile Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of 2-Alkanamino Benzimidazole Derivatives**, *Oriental Journal of Chemistry*, Vol 32, no.1.
- [42] Rostinawati, Tina, 2009, **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap *Escherichia***

coli, Salmonella typhi dan Staphylococcus aureus dengan Metode Difusi Agar, Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran.

- [43] Greenwood, 1995, **Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial and Chemoterapy**, Mc. Graw Hill Company, USA.
- [44] Harti, A. Sri, Heni, N. Kusumawati, Estuningsih, 2012, **Perbandingan Uji Aktivitas Anti Bakteri Chitooligosakarida Terhadap Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus Dan Salmonella Typhi Secara In Vitro**, Jurnal Biomedika, Universitas Setia Budi

