

**Nanoenkapsulasi 2-Sitronelil Benzimidazol dengan Penyalut
Kasein Misel dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri**

SKRIPSI

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

oleh:

YULIATIN

145090207111013



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



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Nanoenkapsulasi 2-Sitronelil Benzimidazol dengan Penyalut
Kasein Misel dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri

oleh:
YULIATIN
145090207111013

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 17.....Juli.....2018.
dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I



Dr. Warsito, MS

NIP.195907121985031004

Pembimbing II



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

NIP.197310202002121001



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia Fakultas
KIMIA Universitas Brawijaya

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

NIP.197310202002121001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yuliatin
NIM : 145090207111013
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul :

Nanoenkapsulasi 2-Sitronelil Benzimidazol dengan Penyalut Kasein Misel 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, 17 JUL 2018

Yang menyatakan,



(Yuliatin)
NIM. 145090207111013

Nanoenkapsulasi 2-Sitronelil Benzimidazol dengan Penyalut Kasein Misel dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri

ABSTRAK

Derivatif benzimidazol seperti 2-sitronelil benzimidazol diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Escherichia coli*. Nanoenkapsulasi didefinisikan sebagai proses dimana molekul bioaktif dikelilingi oleh lapisan, atau tertanam dalam matriks homogen maupun heterogen yang memiliki keunggulan dapat melindungi dari faktor luar seperti pH, oksigen dan cahaya. Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dibuat dengan menggunakan penyalut kasein misel. Karakterisasi nanokapsul menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dan spektrofotometer *Forier Transform Infrared* (FT-IR) dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), sedangkan penentuan profil pelepasan dan penentuan jumlah bahan aktif yang terenkapsulasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol memiliki ukuran rata-rata partikel 1017 nm. Adanya serapan gugus imina pada bilangan gelombang $1651,72\text{ cm}^{-1}$ spektra FT-IR menunjukkan bahan aktif sudah tersalut. Morfologi permukaan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol berbentuk trapesium dengan permukaan kasar dan tidak rata. Efisiensi enkapsulasi paling besar yaitu 79,97%. Penentuan profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol pada waktu pengadukan 15 hingga 45 menit terjadi peningkatan konsentrasi yang konstan, dan terjadi peningkatan yang signifikan pada waktu pengadukan 60 menit. Senyawa 2-sitronelil benzimidazol yang dilakukan enkapsulasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dengan diameter zona hambat masing-masing 10 mm, dan 8,3 mm.

Kata kunci : nanoenkapsulasi, 2-sitronelil benzimidazol, kasein misel, antibakteri





Nanoencapsulation of 2-Citronellyl Benzimidazole with Casein Micelle as a Wall Material and Activity Test as Antibacterial

ABSTRACT

Benzimidazole derivative such as 2-citronellyl benzimidazole known to have antibacterial activity against gram-positive bacteria of *Staphylococcus aureus* and gram negative of *Escherichia coli*. Nanoencapsulation is defined as a process in which bioactive compounds are surrounded by a coating, or embedded in a homogeneous or heterogeneous matrix which has the advantage of protecting from external factors such as pH, oxygen and light. 2-Citronellyl benzimidazole nanocapsule was prepared by using a casein micelle coating. Characterization of nanocapsule using Particle Size Analyzer (PSA) and Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrophotometer and Scanning Electron Microscopy (SEM), while the determination of the release profile and determination of the amount of encapsulated active compound by using UV-Vis spectrophotometer. The 2-citronellyl benzimidazole nanocapsule has an average particle size of 1017 nm. The presence of imine group has wave number at 1651.72 cm^{-1} FT-IR spectra this band indicates the active compound has been coated. Surface morphology of 2-citronellyl benzimidazole nanocapsule is trapezoid with rough and uneven surface. The greatest encapsulation efficiency is 79.97%. Determination of 2-citronellyl benzimidazole release profile at stirring time of 15 to 45 minutes increased constant concentration, and there was a significant increase at 60 minutes stirring time. Moreover, 2-Citronellyl benzimidazole encapsulated has antibacterial activity against *S. aureus*, and *E. coli* with inhibitory zone diameters of 10 mm and 8.3 mm respectively.

Keywords : nanoencapsulation, 2-citronellyl benzimidazole, casein micelle, antibacterial



KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas kelimpahan nikmat dan rahmat-Nya sehingga dapat terselesaikannya penyusunan skripsi dengan judul “ **Nanoenkapsulasi 2-Sitronelil Benzimidazol dengan Penyalut Kasein Misel dan Uji Aktivitasnya 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.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Warsito, MS dan Masruri, S.Si.,M.Si.,Ph.D. atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Hermin Sulistyarti, Ph.D. selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan semangat dan masukan kepada penulis selama masa studi.
3. Dosen penguji seminar proposal, kemajuan (Dr. Elvina Dhiaul Iftitah ,M.Si) dan penguji ujian akhir skripsi (Dr. Diah Mardiana, MS) atas saran kepada penulis
4. Ketua Jurusan Kimia, dosen, staf dan karyawan, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
5. Kepada kedua orang tua serta keluarga yang selalu memberi semangat, dukungan serta do'a hingga dapat terselesaikannya penyusunan skripsi ini.
6. Teman satu tim penelitian (Fety, Neni dan Kurnia) atas bantuan yang diberikan kepada penulis.

7. Teman –teman kimia yang telah memberikan bantuan dan semangat kepada penulis
8. Teman asrama al-hijrah yaitu Sabtiyah, Laily, Faiq, Evita, Feni, Riska dan lain-lain
9. Seluruh pihak dan instansi yang membantu atas terselesaikannya skripsi ini.

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 maupun pembaca.



Malang,.....

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.1 Perumusan Masalah	2
1.2 Batasan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
1.1 Potensi Derivatif Benzimidazol sebagai Antibakteri	5
1.2 Penggunaan Nanoenkapsulasi untuk Senyawa Antibakteri	7
1.3 Potensi Kasein Misel sebagai Penyalut dalam Nanoenkapsulasi	8
1.4 Spektroskopi FT-IR	11
1.5 <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA)	12
1.6 <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM)	12
1.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri	13
BAB III METODE PENELITIAN	15
3.1 Tempat dan Waktu	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	15
3.3 Tahapan Penelitian	15
3.4 Prosedur Kerja	16

3.4.1 Identifikasi Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol	16
3.4.2 Isolasi Kasein dari Susu	16
3.4.3 Pembuatan Nanokapsul	16
3.4.4 Penentuan Efisiensi Nanokapsul dengan Spektrofotometer UV-Vis	17
3.4.5 Karakterisasi Nanokapsul	
3.4.5.1 Karakterisasi dengan FT-IR	17
3.4.5.2 Karakterisasi dengan PSA	18
3.4.5.3 Karakterisasi dengan SEM	18
3.4.6 Penentuan Profil Pelepasan Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol	18
3.4.7 Uji Aktivitas Antibakteri	
3.4.7.1 Peremajaan dan Penginokulasian	19
3.4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri	19
3.4.7.3 Penentuan Zona Hambat	19
3.4.8 Analisis Data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Identifikasi Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol	23
4.2 Isolasi Kasein dari Susu	24
4.3 Nanokapsul 2-Sitronelil Benzimidazol	25
4.4 Penentuan Efisiensi Nanokapsul dengan Spektrofotometer UV-Vis	27
4.5 Karakterisasi Nanokapsul	
4.5.1 Karakterisasi dengan FT-IR	28
4.5.2 Karakterisasi dengan PSA	30
4.5.3 Karakterisasi dengan SEM	32
4.6 Profil Pelepasan Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol	33
4.7 Uji Aktivitas Antibakteri	
4.7.1 Penentuan Zona Hambat	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	49



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Rendemen isolasi kasein	25
Tabel 4.2	Massa nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	27
Tabel 4.3	Pengukuran efisiensi nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	27
Tabel 4.4	Gugus fungsi dan bilangan gelombang nanokapsul benzimidazol terhadap isolat kasein dan blanko	30
Tabel 4.5	Ukuran partikel nanokapsul blanko	31
Tabel 4.6	Ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	31
Tabel 4.7	Diameter zona hambat	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	1 <i>H</i> - Benzimidazol	5
Gambar 2.2	2-Sitronelil benzimidazol	6
Gambar 2.3	Polimer <i>nanospheres</i> dan Polimer nanokapsul	8
Gambar 2.4	Struktur Kasein Misel dan Komposisinya	10
Gambar 4.1	Struktur Kasein Misel dan Komposisinya	23
Gambar 4.2	Spektra massa 2-sitronelil benzimidazol	24
Gambar 4.3	Kasein hasil isolasi	25
Gambar 4.4	Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	26
Gambar 4.5	Spektra IR nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dibandingkan dengan blanko dan kasein	28
Gambar 4.6	Distribusi ukuran partikel nanokapsul blanko	30
Gambar 4.7	Distribusi ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	31
Gambar 4.8	Morfologi permukaan nanokapsul benzimidazol (kanan) dan blanko (kiri)	33
Gambar 4.9	Profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol	34
Gambar 4.10	Zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri <i>S. aureus</i> (kanan) dan <i>E. coli</i> (kiri)	35
Gambar 4.11	Diameter zona hambat	36



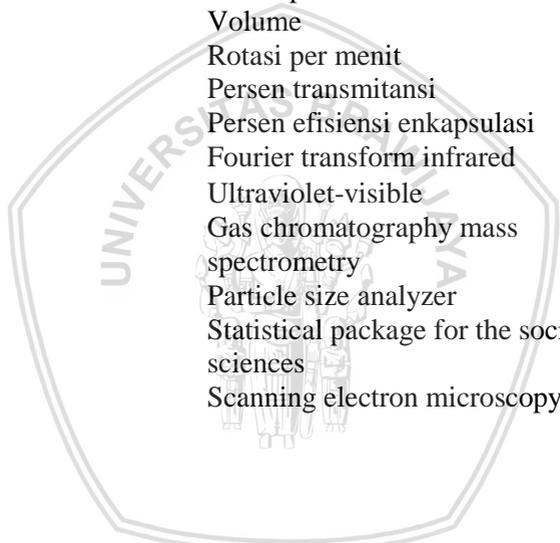
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Kerja	49
Lampiran B. Perhitungan	
B.1 Pembuatan buffer asetat pH 4,6	50
B.2 Perhitungan rendemen	50
B.3 Pembuatan buffer fosfat pH 8,7	51
B.4 Pembuatan larutan CaCl_2 10%	51
B.5 Pembuatan NaOH 0,1 M	51
B.6 Pembuatan larutan 2-sitronelil benzimidazol untuk kurva baku	51
B.7 Perhitungan efisiensi	52
B.8 Perhitungan jumlah bakteri	53
B.9 Perhitungan zona hambat	53
Lampiran C. Kurva baku 2-sitronelil benzimidazol	54
C.1 Data kurva baku 2-sitronelil benzimidazol	54
C.2 Data penentuan efisiensi	55
C.3 Data profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol	55
Lampiran D. Data hasil FT-IR	
D.1 Spektra isolat kasein	56
D.2 Spektra blanko	56
D.3 Spektra nanokapsul benzimidazol	57
Lampiran E. Data hasil PSA	
E.1 Nanokapsul blanko	57
E.2 Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol	59
E.3 Uji statistik	60
Lampiran F. Dokumentasi penelitian	
F.1 Isolasi kasein	61
F.2 Pembuatan nanokapsul	62



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/ singkatan	Keterangan
$^{\circ}\text{C}$	Derajat Celcius
mL	Mililiter
mg	Miligram
mm	milimeter
g	Gram
μL	Mikroliter
CFU/mL	Colony forming unit per milliliter
TIC	Total ionic chromatogram
m/z	Massa per rasio muatan
V	Volume
rpm	Rotasi per menit
%T	Persen transmitansi
%EE	Persen efisiensi enkapsulasi
FT-IR	Fourier transform infrared
UV-Vis	Ultraviolet-visible
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
PSA	Particle size analyzer
SPSS	Statistical package for the social sciences
SEM	Scanning electron microscopy



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengembangan obat-obatan dalam kimia medis selalu menjadi perhatian bagi peneliti dalam mengatasi masalah berbagai jenis penyakit yang semakin banyak jumlahnya. Sehingga menjadi tantangan besar untuk memenuhi kebutuhan masyarakat akan obat-obatan seperti obat antibakteri, antijamur, anti-inflamasi dan lain-lain. Pemakaian obat antibakteri telah banyak digunakan dalam menanggulangi berbagai penyakit infeksi. Salah satu senyawa yang dapat dijadikan obat antibakteri adalah turunan benzimidazol. Turunan benzimidazol yang dilaporkan memiliki sifat antibakteri adalah 2-sitronelil benzimidazol, sehingga dapat digunakan sebagai obat antibakteri [1]. Senyawa 2-sitronelil benzimidazol diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Enteropathogenic escherichia coli (EPEC)*, *Salmonella thypi* [2, 3].

Daya tahan bakteri terhadap agen antibakteri menjadi tantangan besar dalam perkembangan farmakologi. Mikroorganisme telah berkembang selama bertahun-tahun dan mengembangkan ketahanannya terhadap agen antibakteri yang ada. Oleh karena itu, diperlukan teknologi alternatif dan inovasi obat baru untuk menemukan solusi jangka panjang dalam masalah ini. Salah satu teknologi semacam itu adalah nanoenkapsulasi senyawa bioaktif dengan aktivitas antibakteri. Nanoenkapsulasi merupakan salah satu bagian dari nanoteknologi yang telah berkembang di beberapa industri termasuk obat-obatan dengan dampak yang sangat baik [4].

Enkapsulasi didefinisikan sebagai proses dimana molekul bioaktif dikelilingi oleh lapisan, atau tertanam dalam matriks homogen maupun heterogen untuk memberi kapsul kecil dengan banyak khasiat [5]. Dalam pembuatan nanokapsul melibatkan penyalutan yang berukuran nano untuk mengemas suatu molekul bioaktif agar terlindungi dari faktor luar seperti pH, oksigen, cahaya dan lain-lain [6]. Selain itu, juga dapat menstabilkan molekul volatil, dapat meningkatkan mekanisme penyerapan seluler [7], dapat meningkatkan aktivitas biologinya karena adanya peningkatan rasio permukaan terhadap volume dengan mengurangi ukuran partikel

menjadi nano [8]. Sistem nanokapsul memiliki kemampuan untuk melepaskan obat dan membawa zat aktif yang menyertakan efisiensi enkapsulasi obat yang tinggi karena kelarutan obat yang optimal dalam inti [9].

Pada literatur, ada beberapa penyalut yang digunakan dalam pembuatan nanokapsul, seperti kitosan nanopartikel, PCL nanopartikel, alginat, campuran gelatin dengan gum arab dan natrium kaseinat [10]. Namun kasein misel lebih disukai sebagai penyalut karena memiliki ukuran yang kecil pada kisaran 40-300 nm dengan ukuran rata-rata 150 nm. Selain itu, adanya kasein misel yang terdiri dari κ -kasein, β -kasein, α -kasein bersifat hidrofobik dan α -kasein bersifat hidrofilik sehingga pada lapisan permukaan dapat berdifusi untuk menstabilkan misel melalui elektrostatik intermolekuler dan tolakan sterik [11]. Disamping itu, mampu untuk menggabungkan diri menjadi nanopartikel [12] dan kaseinat dilaporkan sebagai pembawa senyawa antimikroba yang ramah lingkungan [13].

Penelitian yang dilakukan oleh Herkulano, dkk [14] dengan variasi jumlah atau konsentrasi bahan penyalut dihasilkan perbedaan nilai efisiensi enkapsulasi. Dengan demikian, menarik untuk mempelajari pengaruh dari variasi jumlah kasein terhadap efisiensi dari nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, rumusan masalah yang dapat diambil adalah :

1. Berapakah efisiensi dari pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol menggunakan penyalut kasein misel?
2. Bagaimana karakteristik nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dengan penyalut kasein misel ?
3. Bagaimana profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol dari penyalut kasein misel?
4. Bagaimana aktivitas antibakteri dari 2-sitronelil benzimidazol yang dilakukan nanoenkapsulasi dengan penyalut kasein misel?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Senyawa bioaktif 2-sitronelil benzimidazol berasal dari Institut Atsiri Universitas Brawijaya Malang
2. Variasi jumlah kasein yang digunakan adalah 3, 4, dan 5 gram
3. Variasi waktu untuk profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol adalah 15, 30, 45, dan 60 menit
4. Pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol menggunakan homogenizer dengan tipe IKA T25 Basic
5. Bakteri yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah bakteri gram positif *S. aureus* dan bakteri gram negatif *E. coli*

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan efisiensi dari pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol menggunakan penyalut kasein misel
2. Menentukan karakteristik nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dengan penyalut kasein misel
3. Menentukan profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol dari penyalut kasein misel
4. Menentukan aktivitas antibakteri dari 2-sitronelil benzimidazol yang dilakukan nanoenkapsulasi dengan penyalut kasein misel

1.5 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini, diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu dalam melindungi senyawa 2-sitronelil benzimidazol serta dalam meningkatkan resistensinya terhadap bakteri melalui nanoenkapsulasi. Disamping itu juga dapat digunakan dalam pengembangan senyawa 2-sitronelil benzimidazol untuk meningkatkan nilai jual beli.

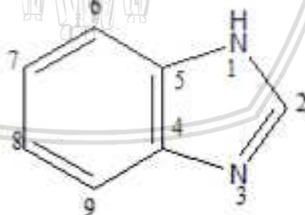
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi Derivatif Benzimidazol Sebagai Antibakteri

Agen antibakteri merupakan zat yang diturunkan dari mikroba atau disintesis secara artifisial yang menghambat pertumbuhan atau menghancurkan bakteri. Jika agen tersebut benar-benar membunuh bakteri dikenal dengan bakterisida dan jika menghambat pertumbuhan bakteri dikenal dengan bakteriostatik. Senyawa antibakteri biasanya diberikan pada konsentrasi yang tidak beracun atau berbahaya bagi penggunaannya namun bisa dapat digunakan sebagai senyawa terapeutik yang efektif untuk menghentikan penyakit bakteri [15].

Benzimidazol biasa disebut dengan derivatif benzoimidazol. Meskipun benzimidazol adalah nama yang paling umum dari senyawa induk seri ini, nama lain seperti 1,3-benzodiazol sering digunakan [16]. Benzimidazol berwujud kristal berwarna coklat muda dengan berat molekul 118.14 g/mol dan memiliki titik leleh 169 - 171 °C (336 - 340 °F) [17]. Benzimidazol adalah senyawa bisiklik yang terdiri dari cincin benzena yang menyatu dengan imidazol, dan memiliki banyak sifat farmakologis[18]. Struktur umum dari benzimidazol sebagai berikut :



Gambar 2.1: 1*H*-Benzimidazole [16]

Benzimidazol merupakan senyawa yang terbentuk oleh reaksi kondensasi karbonil dengan amina primer[19] dan termasuk reagen pengadsorpsi, dimana terdapat cincin azetidinon yang mampu memunculkan beragam aktivitas biologis seperti aktivitas anti jamur

dan anti bakteri[1]. Benzimidazol memiliki karakteristik asam. Adanya gugus -NH- menjadikan benzimidazol bersifat asam kuat dan juga lemah. Dan mampu untuk membentuk garam dengan asam yang berbeda [20].

Substitusi pada posisi 1, 2 dan 5 pada cincin benzimidazol adalah titik dimana dapat menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis[20]. Senyawa 2-sitronelil benzimidazol berbentuk padatan berwarna kuning dan dapat disintesis dengan mereaksikan 1,2 fenildiamin dengan sitronelal [1]. Struktur dari 2-sitronelil benzimidazol sebagai berikut :



Gambar 2.2: 2-sitronelil benzimidazol [1]

Peneliti mencari kegunaan dan aplikasi baru dari senyawa heterosiklik. Senyawa derivatif benzimidazol telah banyak digunakan dalam kimia medis dan pengembangan obat karena memiliki banyak aktivitas medis dan biologi seperti antitumor, antibakteri, antijamur, antiviral, antidepresan, analgesik, anti-inflamasi dan sifat antidiabetes. Digunakan secara luas sebagai obat anti-cacing, untuk mengobati orang dan hewan yang terjangkit infeksi cacing pada saluran cerna [3].

Benzimidazol heterosiklik merupakan kunci farmakofor, dan benzimidazol tersubstitusi telah menimbulkan minat yang cukup besar sebagai senyawa dengan aktivitas biologis yang luas dan toksisitas yang relatif rendah [21]. Diketahui 2-sitronelil benzimidazol memiliki aktivitas terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Enteropathogenic escherichia coli (EPEC)*, *Salmonella thypi* [2, 3]. Senyawa 2,5,6 - dan 2,5,7-trisubstitusi benzimidazol menunjukkan aktivitas yang sangat baik yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan lebih dari 90% pada 1 μg / mL terhadap bakteri *Francisella tularensis* [22]. Senyawa derivatif benzimidazol tersubstitusi pada posisi 2, *benzoxazole* dan *benzothiazole* dievaluasi terhadap bakteri *E. coli* dan

S. aureus dengan pengukuran konsentrasi hambat minimum menunjukkan zona hambatan pertumbuhan yang signifikan [23].

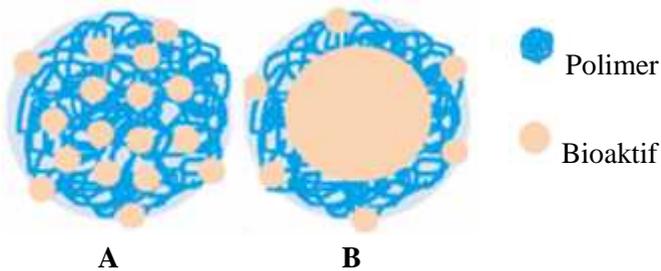
2.2 Penggunaan Nanoenkapsulasi Untuk Senyawa Antibakteri

Nanoteknologi telah dianggap sebagai salah satu teknologi utama pada abad ke 21 dan menjanjikan sebuah revolusi dibidang farmasi, medis dan makanan. Teknologi ini melibatkan perancangan, sintesis, karakterisasi dan penerapan partikel atau sistem dengan dimensi kurang dari 1 μm . Nanoteknologi sekarang diterapkan dalam sejumlah produk komersial seperti kosmetik dan tabir surya, obat-obatan, tambalan gigi, makanan serta dalam filtrasi air dan sistem katalitik [24].

Resistensi bakteri terhadap agen antibakteri menjadi salah satu tantangan besar dalam industri obat dalam memenuhi kebutuhan, sehingga perlu mencari dan menemukan sumber zat baru dengan sifat antibakteri [4]. Penggabungan senyawa bioaktif dalam sistem enkapsulasi bisa menjadi pendekatan yang baik. Enkapsulasi didefinisikan sebagai proses di mana molekul bioaktif dikelilingi oleh lapisan, atau tertanam dalam matriks homogen maupun heterogen, untuk memberi kapsul kecil dengan banyak khasiat [5]. Enkapsulasi dalam partikel nanometrik merupakan alternatif yang bagus, karena dengan ukuran nano dapat meningkatkan mekanisme penyerapan seluler dari pada sistem partikulat lainnya [7], dapat meningkatkan aktivitas biologinya karena adanya peningkatan rasio permukaan terhadap volume dengan mengurangi ukuran partikel menjadi nano [8]. Disamping itu, memiliki kemampuan untuk melepaskan obat, bisa memperbaiki kestabilan zat aktif, serta membawa zat aktif yang menyertakan efisiensi enkapsulasi obat yang tinggi karena kelarutan obat yang optimal dalam inti [9].

Umumnya, nanopartikel didefinisikan sebagai partikel koloid padat yang mencakup *nanospheres* dan nanokapsul. Salah satu karakteristik mendasar mereka adalah ukurannya, yang umumnya diambil sekitar 5-10 nm dengan batas ukuran atas ~ 1000 nm, meskipun kisaran umumnya diperoleh adalah 100-500 nm [9]. Nanokapsul adalah sistem visikular, memiliki dua bagian yaitu dinding polimer dan inti dimana komponen bioaktif diperangkap pada sebuah rongga yang dikelilingi oleh membran polimer

sedangkan *nanospheres* sistem matriks dimana komponen bioaktif tersebar secara merata [4].



Gambar 2.3: A) Polimer *nanospheres* , B) Polimer nanokapsul [4]

Dalam penelitian sebelumnya, sudah dilakukan studi enkapsulasi senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri seperti enkapsulasi kapulaga dalam kitosan nanokomposit diketahui memiliki efisiensi enkapsulasi lebih dari 90% dan memiliki potensi antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* [25], pembuatan nanokapsul *Eucalyptus staigeriana* dengan penyalut jambu mete yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Listeria monocytogenes* (Gram-positive) and *Salmonella enteritidis* (Gram-negative) [14].

2.3 Potensi Kasein Misel Sebagai Penyalut Dalam Nanoenkapsulasi

Protein merupakan komponen makro molekul utama yang dibutuhkan makhluk hidup. Fungsi protein lebih diutamakan untuk sintesis protein-protein baru sesuai kebutuhan tubuh, sementara karbohidrat dan lipid digunakan untuk menjamin ketersediaan energi untuk tubuh. Protein susu merupakan kelompok molekul yang bersifat heterogen, terdiri dari lima kategori yaitu kasein, protein *whhey*, protein globul lemak susu, enzim dan protein minor lainnya. Protein utama adalah kasein dan protein *whhey* [26].

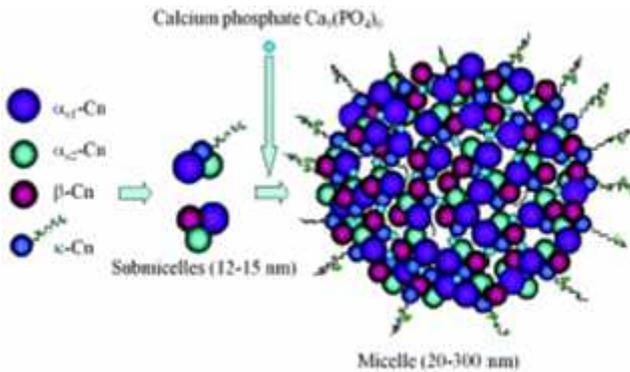
Kasein merupakan senyawa protein kompleks dengan garam Ca, P dan sejumlah kecil Mg dan sitrat sebagai agregat makromolekul yang disebut kalsium fosfo kaseinat atau kasein misel. Kasein dapat dipresipitasi oleh asam atau enzim rennin dan

presipitasi kasein oleh rennin ini merupakan dasar untuk pembentukan *curd* dalam keju. Dalam susu sapi, kasein terdiri dari empat peptida: s_1 , s_2 , dan berbeda dalam kandungan asam amino, fosfor dan karbohidratnya tetapi serupa dalam sifat ampifilik mereka. Daerah hidrofilik dan hidrofobik kasein menunjukkan distribusi blok dalam rantai protein. Peptida kasein membawa muatan negatif pada permukaannya sebagai akibat dari fosforilasi dan cenderung mengikat nanoclusters dari kalsium fosfat amorf. Karena sifat-sifat ini, dalam kondisi yang sesuai, molekul kasein teraglomerasi menjadi misel bola [27].

Kasein misel mengandung 94% protein dan 6% koloid kalsium fosfat dalam bentuk kering, yang terdiri dari kalsium, magnesium, fosfat, dan sitrat. Dalam kasein misel terdapat dua jenis ikatan, tarikan hidrofobik (kekuatan pendorong untuk pembentukan kasein misel) dan tolakan elektrostatis (bertanggung jawab untuk membatasi pertumbuhan polimer) yang bertanggung jawab dalam struktur kasein misel [28].

Peptida kasein hadir dalam bentuk amorf, aglomerat stabil yang dikenal sebagai kasein misel dalam kondisi yang sesuai [29] dengan jari-jari 50–500 nm dan massa $10^3 - 3 \times 10^6$ kDa [30]. Kasein misel yang khas mengandung ribuan molekul kasein, membentuk 94% dari misel. Sebagian besar dari mereka membentuk kompleks stabil termodinamis dengan kalsium fosfat amorf, yang menyumbang 6% dari misel. Kalsium fosfat amorf membentuk nanoclusters bola dengan diameter 3,5-5,0 nm, terpisah berjarak ~18 nm [31].

Dalam struktur kasein misel, peptida s_1 , s_2 , dan membangun sebagian besar di bagian dalam. Sementara α -kasein membentuk lapisan 'berbulu' diluar yang menstabilkan misel secara sterik. Menariknya, lapisan 'berbulu' ini tidak terdistribusi merata dan hanya menutupi sebagian permukaan micellar (**Gambar 2.4**). Struktur internal dari kasein misel sebenarnya tidak pasti, dan berbagai model telah dibangun untuk menggambarannya [27].



Gambar 2.4: Struktur Kasein Misel dan Komposisinya [32]

Kasein misel menunjukkan perilaku yang beragantung pada pH, mengalami pengetatan (*tightening*) dengan menurunnya pH dan mengalami pembengkakan (*swelling*) dengan meningkatnya pH. Potensial zeta yang diukur untuk kasein misel ditemukan menjadi -8 mV pada pH netral dan mendekati 0 mV dengan menurunnya pH. Setelah mencapai titik di mana misel menjadi tidak stabil, menjadi sulit untuk memperkirakan potensialnya, tetapi diharapkan menjadi 0 sekitar pH 4,8 dan memiliki nilai positif pada pH yang lebih rendah [33]. Menurunkan pH di bawah titik isoelektrik 4.6-4.8 menyebabkan agregasi dan pengendapan misel dikombinasikan dengan pelepasan kalsium, menunjukkan pentingnya ketersediaan kation untuk pembentukan kasein misel. Faktanya, dipelajari pada natrium dan kalsium kaseinat serta kasein menunjukkan bahwa kation yang berbeda dapat mempengaruhi struktur misel dengan cara yang rumit [27].

Kasein adalah protein heterogen dan terdiri dari empat protein utama (kasein s_1 , s_2 , dan) dan protein ini memiliki kecenderungan kuat untuk berasosiasi satu sama lain untuk membentuk kasein misel (~250 kDa) dan itu berada dalam kesetimbangan dengan molekul kasein bebas (~25 kDa), dengan demikian kaseinat cenderung menstabilkan emulsi agar stabil selama pemanasan karena strukturnya yang tidak mengalami perubahan konformasi yang disebabkan oleh panas seperti protein globular, dan karena terdapat kombinasi mekanisme stabilisasi elektrostatis dan sterik [34].

Dalam enkapsulasi suatu senyawa, kasein misel telah diaplikasikan dalam nanoenkapsulasi pada vitamin D, dihasilkan bioavailabilitas vitamin D yang tinggi, dapat melindungi vitamin D terhadap degradasi akibat panas dan penyimpanan serta menunjukkan bahwa kasein misel dapat digunakan untuk nanoenkapsulasi dalam aplikasi makanan dan minuman [35]. Kasein misel juga digunakan dalam enkapsulasi senyawa propolis sebagai formulasi alternatif senyawa antimikroba dengan ukuran mikro dan nano partikel[36].

2.4 Spektroskopi FT-IR

Spektroskopi FT-IR adalah suatu teknik karakterisasi yang banyak digunakan dalam fisika, kimia dan biologi. Spektroskopi FT-IR memiliki keuntungan seperti resolusi spektral yang tinggi, rasio sinyal ke *noise* yang baik, dan kemampuan untuk mengukur wilayah spektrum yang luas dalam waktu yang singkat [37]. Sinar infra merah (infra red = IR) mempunyai panjang gelombang yang lebih panjang dibandingkan dengan UV-Vis, sehingga energinya lebih rendah dengan bilangan gelombang antara $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ atau sekitar ($1,7 \times 10^{-3}\text{ cm}$ sampai dengan $2,5 \times 10^{-4}\text{ cm}$). Sinar infra merah hanya dapat menyebabkan vibrasi (getaran) pada ikatan baik berupa rentangan (*stretching*) maupun berupa bengkokan (*bending*). Energi vibrasi untuk molekul adalah spesifik yang berarti bilangan gelombangnyaapun spesifik. Namun pada prakteknya spektroskopi IR lebih diperuntukkan untuk menentukan adanya gugus-gugus fungsional utama dalam suatu sampel yang diperoleh berdasarkan bilangan gelombang yang dibutuhkan untuk vibrasi tersebut [38].

Spektra infra merah (IR) adalah gambar antara persen transmitansi (%T) terhadap bilangan gelombang. Setiap ikatan mempunyai bilangan gelombang (ν) yang spesifik sehingga spektra IR dapat digunakan untuk melacak gugus fungsional suatu molekul. Dengan demikian setiap molekul mempunyai spektra IR yang spesifik atau sidik jari (*fingerprint*) tertentu. Namun demikian spektra IR banyak digunakan untuk melacak gugus fungsi yang spesifik seperti alkena, alkuna, karbonil, hidroksi, nitril, amina, amida dan lain-lain yang berada pada sekitar $4000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Menganalisis spektra IR dimulai dari kiri ke kanan atau dari bilangan gelombang yang paling besar ke kecil [38].

2.5 Particle Size Analyzer (PSA)

Particle Size Analyzer (PSA) adalah salah satu metode pengukuran dalam riset nanoteknologi. Metode ini dapat menganalisis partikel suatu sampel yang bertujuan menentukan ukuran partikel dan distribusinya dari sampel yang representatif. Ukuran partikel mempengaruhi banyak sifat material partikulat dan merupakan indikator kualitas dan kinerja. Berlaku untuk bubuk, suspensi, emulsi, dan aerosol. Ukuran dan bentuk bubuk mempengaruhi sifat aliran dan pemadatan. Banyak operasi dan teknologi untuk perubahan dalam ukuran partikel termasuk melalui penghancuran, homogenisasi, emulsifikasi, mikrofluidisasi dan lain-lain. Tahapan pemisahan seperti screening, penyaringan, siklon dan lain-lain [39].

Ukuran partikel dapat ditentukan dengan mengukur perubahan acak dalam intensitas cahaya yang tersebar dari suspensi atau larutan. Partikel kecil dalam suspensi mengalami gerak termal acak yang dikenal sebagai gerak Brown. Gerak acak ini diukur untuk menghitung ukuran partikel menggunakan proses *Dynamic Light Scattering*. Hasil utama dari *Dynamic Light Scattering* (DLS) biasanya nilai rata-rata dari distribusi intensitas (disebut Z rata-rata) dan indeks polidispersitas (PDI) untuk menggambarkan lebar distribusi. Dan mungkin untuk mengubah dari intensitas ke volume atau distribusi angka untuk dibandingkan dengan teknik lain. Analisis gambar didasarkan pada distribusi bilangan yang sering dikonversi ke basis volume, dan dalam hal ini ini adalah konversi yang diterima dan valid. Gambar hasil analisis dengan PSA dapat melaporkan distribusi berdasarkan panjang partikel dibandingkan dengan ekuivalen bola, dan dapat membangun distribusi volume berdasarkan bentuk selain bola [39].

2.6 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) adalah teknik lain di mana hanya jumlah miligram material yang dapat digunakan untuk menentukan ukuran partikel, bentuk, dan tekstur. Dalam SEM, berkas elektron halus memindai seluruh sampel yang disiapkan dalam serangkaian trek paralel. Elektron berinteraksi dengan sampel, dan menghasilkan sinyal yang berbeda yang dapat dideteksi dan ditampilkan pada layar tabung sinar katoda. Partikel kurang dari 1

nm dapat dilihat dan, karena kedalaman fokus jauh lebih besar daripada cahaya mikroskop, informasi pada tekstur permukaan dapat dihasilkan. SEM membutuhkan lebih banyak persiapan sampel yang memakan waktu dibandingkan dengan mikroskop optik dan tidak dapat membedakan antara bahan kristal dan nonkristalin. Sementara informasi yang diperoleh bersifat visual dan deskriptif, biasanya tidak kuantitatif karena hanya beberapa partikel yang terlihat di bidang tampilan. Namun, ketika SEM digunakan dengan teknik lain dapat memberikan informasi tambahan yang dapat membantu menjelaskan sifat bubuk seperti masalah aglomerasi atau aliran [40].

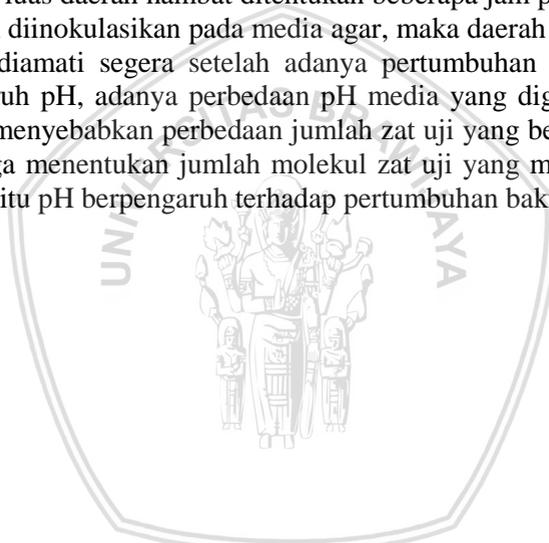
2.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri terhadap antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan suatu cakram kertas saring, yaitu suatu cawan yang berliang renik dan suatu silinder tidak beralas yang mengelilingi obat dalam jumlah tertentu ditempatkan pada pembedahan padat yang telah ditanami dengan biakan tebal bakteri yang diperiksa setelah pengeraman. Garis tengah daerah hambatan jernih yang mengelilingi obat dianggap sebagai ukuran kekuatan hambatan terhadap bakteri yang diperiksa. Metode dilusi adalah suatu uji aktivitas antibakteri dimana sejumlah zat antimikroba dimasukkan ke dalam medium bakteriologi padat atau cair, biasanya digunakan pengenceran dua kali lipat. Metode dilusi bermanfaat untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri yang diuji [41]. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar antara lain [42] :

- a. Pradifusi, perbedaan waktu pradifusi mempengaruhi jarak difusi dari zat uji yaitu difusi antar pencadang.
- b. Ketebalan medium agar penting untuk memperoleh sensitivitas yang optimal. Perbedaan ketebalan media agar mempengaruhi diameter hambatan. Semakin tebal media, semakin kecil diameter hambatan yang terjadi.
- c. Kerapatan inokulum, ukuran inokulum merupakan faktor terpenting yang mempengaruhi lebar daerah hambatan, jumlah inokulum yang lebih sedikit menyebabkan obat dapat berdifusi lebih jauh, sehingga daerah yang dihasilkan lebih

besar, sedangkan jika jumlah inokulum lebih besar maka akan dihasilkan daerah hambat yang kecil.

- d. Komposisi media agar, perubahan komposisi media padat merubah sifat media sehingga jarak difusi berubah. Media agar berpengaruh terhadap ukuran daerah hambat dalam hal mempengaruhi aktivitas beberapa bakteri, mempengaruhi kecepatan difusi antibakteri dan mempengaruhi kecepatan pertumbuhan antibakteri.
- e. Temperatur inkubasi, mayoritas bakteri tumbuh baik pada temperatur 37°C .
- f. Waktu inkubasi disesuaikan dengan pertumbuhan bakteri, karena luas daerah hambat ditentukan beberapa jam pertama, setelah diinokulasikan pada media agar, maka daerah hambat dapat diamati segera setelah adanya pertumbuhan bakteri. Pengaruh pH, adanya perbedaan pH media yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan jumlah zat uji yang berdifusi, pH juga menentukan jumlah molekul zat uji yang mengion. Selain itu pH berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama bulan maret hingga juni 2018 di Laboratorium Kimia Organik, Institut Atsiri, Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Analisis menggunakan SEM dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang dan analisis menggunakan PSA dilakukan di Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain beaker gelas, gelas ukur 10 ml, pipet ukur 0,5 ml, labu takar 10 ml, bola hisap, gelas arloji, *hot plate*, pH meter, termometer, oven, pengaduk magnet, stirer, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, batang pengaduk, neraca analitik, cawan petri, jarum ose, inkubator, *vortex*, *haemocytometer*, *spreader*, *coke bor*, mikropipet, mikroskop, homogenizer dengan tipe IKA T25 Basic, Spektrofotometer FT-IR (8400S SHIMADZU), *freeze dryer*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601, PSA, SEM.

Bahan yang digunakan antara lain 2-sitronelil benzimidazol yang berasal dari Institut Atsiri Universitas Brawijaya, susu sapi, buffer asetat pH 4,6, etanol, eter, buffer fosfat pH 8,7, metanol, larutan CaCl_2 10%, NaOH 0,1 M, aquades, Nutrien agar, Nutrien Broth biakan *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Identifikasi senyawa 2-sitronelil benzimidazol
2. Isolasi kasein dari susu
3. Pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol
4. Penentuan efisiensi dari pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol
5. Karakterisasi nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol
6. Penentuan profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol
7. Uji aktivitas antibakteri
8. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Identifikasi Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol

Senyawa 2-sitronelil benzimidazol dilakukan identifikasi dengan GC-MS. Senyawa 2-sitronelil benzimidazol sebanyak 0,05 mg dilarutkan dalam 2 ml metanol. Analisis dilakukan dengan menginjeksikan sampel 0,2 μL menggunakan *syringe* pada instrument GC-MS Shimadzu QP2010S. Puncak yang terdeteksi pada kromatogram akan di analisis menggunakan spektra massa. Sehingga hasil akhir analisis diperoleh total ionic chromatogram (TIC) dan spektra massa dari masing-masing komponen [43]

3.4.2 Isolasi Kasein dari Susu

Susu sapi sebanyak 100 ml ditempatkan dalam gelas kimia 300 ml dan dihangatkan dengan *hot plate* sampai suhu 40°C. Ditambahkan 100 ml buffer asetat pH 4,6 secara perlahan sambil di aduk, lalu di diamkan pada temperatur kamar. Endapan di dekantasi dengan sedikit air kemudian ditambahkan 30 ml etanol secara perlahan. Endapan disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan etanol-eter (1:1) 20 ml lalu dicuci dengan 20 ml eter. Endapan dikeringkan dalam oven 100°C lalu di simpan dalam desikator dan ditimbang endapan yang diperoleh.

3.4.3 Pembuatan Nanokapsul 2-Sitronelil Benzimidazol

Kasein sebanyak 3 gram dimasukkan gelas kimia 250 ml. Ditambahkan dengan 50 ml buffer fosfat pH 8,7 lalu dilakukan homogenisasi (homogenizer IKA T25 Basic) dengan kecepatan 9500 rpm. Ditambah 5 mL metanol yang mengandung 1,5 mg 2-sitronelil benzimidazol lalu ditambahkan 1 mL larutan CaCl_2 10% sebanyak enam kali setiap 5 menit saat proses homogenisasi berlangsung. Kemudian pH campuran dicek dengan kertas pH, ditambahkan NaOH 0,1 M atau HCl 0,1 M hingga pH netral. Kemudian dilakukan homogenisasi (homogenizer IKA T25 Basic) dengan kecepatan 9500 rpm selama 5 menit dan disaring endapan dengan kertas saring[36, 44]. Nanokapsul yang diperoleh dilakukan *freeze drying* selama 2 x 24 jam (tekanan 15 Pa, suhu chamber -54°C, suhu sampel -20°C) untuk memperoleh nanokapsul yang kering. Dilakukan dengan prosedur yang sama dengan jumlah kasein yang berbeda yaitu 4 g dan 5 g.

3.4.4 Penentuan Efisiensi dari Pembuatan Nanokapsul

2-Sitronelil Benzimidazol

Dibuat larutan stok 2-sitronelil benzimidazol dengan konsentrasi 100 ppm (3 mg 2-sitronelil benzimidazol dilarutkan dalam 30 ml metanol) . Kemudian larutan stok tersebut diencerkan menjadi 80, 60, 50, 40, 30, 20 dan 10 ppm. Setelah dilakukan pengenceran, masing-masing larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi pertama diisi dengan 5 ml metanol sebagai blanko, dan tabung reaksi kedua hingga ke enam diisi dengan larutan 2-sitronelil benzimidazol 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, dan 100 ppm. Larutan dengan konsentrasi 20 ppm diukur absorbansinya untuk menentukan panjang gelombang maksimum. Kemudian masing-masing larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 yang kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi.

Masing – masing filtrat hasil penyaringan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol sebanyak 1 ml dilarutkan dalam 2 ml metanol dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601. Data absorbansi yang dihasilkan diinterpolasikan dengan persamaan garis dari kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Kemudian dihitung konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol yang tersalut untuk menentukan efisiensi nanokapsul.

3.4.5 Karakterisasi Nanokapsul 2-Sitronelil Benzimidazol

3.4.5.1 Karakterisasi dengan FT-IR

Sampel nanokapsul diambil secukupnya dihaluskan bersama dengan padatan KBr dengan perbandingan 1:10 menggunakan mortar. Campuran tersebut dibuat pellet dengan menggunakan pompa hidrolis hingga menjadi pellet yang transparan. Pellet ditempatkan pada tempat sampel pada instrument FT-IR Shimadzu 8400S. Sehingga akan diperoleh spektra antara bilangan gelombang terhadap persen transmitansi yang menentukan serapan gugus fungsi yang terdapat dalam sampel melalui vibrasi molekul.

3.4.5.2 Karakterisasi dengan PSA

Sampel dilakukan karakterisasi menggunakan PSA untuk mengetahui distribusi ukuran partikel nanokapsul. Sampel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol sebanyak 50 mg didispersikan dalam 7 ml aquades. Kemudian dianalisis menggunakan PSA nano yang berada di Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

3.4.5.3 Karakterisasi dengan SEM

Sampel dilakukan karakterisasi menggunakan SEM untuk mengetahui morfologi permukaan dari nanokapsul. Sedikit sampel nanokapsul diletakkan pada tempat sampel lalu dimasukkan dalam instrumen SEM Hitachi TM-3000. Elektron akan dilepaskan melalui *electron gun*. Lalu lensa elektromagnetik akan memfokuskan berkas elektron. Koil pemindai akan mengarahkan berkas elektron terfokus pada spesimen dan detektor akan menangkap sinyal dari elektron. Analisis dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang.

3.4.6 Penentuan Profil Pelepasan Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol

Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol sebanyak 0,25 g dimasukkan dalam gelas kimia 100 ml. Ditambahkan 10 ml metanol dan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian diaduk dengan menggunakan magnetik stirer dengan waktu 15, 30, 45 dan 60 menit. Filtrat pada masing-masing waktu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 untuk menganalisis konsentrasi dari 2-sitronelil benzimidazol yang terlepas dari penyalut. Data absorbansi yang dihasilkan diinterpolasikan dengan persamaan garis dari kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Setelah diketahui konsentrasi dari 2-sitronelil benzimidazol dari masing – masing waktu, kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi 2-sitronelil yang terlepas terhadap waktu.

3.4.7 Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.7.1 Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri

Nutrien agar sebanyak 4 g dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml lalu ditambahkan aquades hingga 200 ml. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga larut lalu disterilkan. Nutrien agar yang steril tersebut diambil sebanyak 5 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diletakkan dengan kemiringan 30-45⁰ dan ditunggu hingga memadat. Kultur bakteri *E.coli*, dan *S. aureus* diambil sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose, lalu digoreskan zig-zag pada permukaan media agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Nutrient broth sebanyak 1,6 g dalam botol sampel ditambahkan aquades 200 mL. Larutan diaduk hingga larut kemudian disterilkan. *Nutrient broth* yang telah steril dimasukkan dalam tabung reaksi. Bakteri yang telah tumbuh di media agar diambil sebanyak 1 ose, dicelupkan ke dalam media *nutrient broth* sampai tidak ada bakteri yang menempel pada jarum ose, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37⁰C. Suspensi bakteri *E.coli*, dan *S. aureus* dihitung dibawah mikroskop menggunakan *haemocytometer* hingga diperoleh 10⁵-10⁸ CFU/ml.

3.4.7.3 Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Sumuran

Pada penentuan zona hambat nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Nanokapsul benzimidazol 0,25 g dalam 10 ml metanol dilakukan pengadukan menggunakan magnetik stirer selama 47,46 menit, dan dibandingkan dengan lama pengadukan 32,46 dan 17,46 menit sebagai larutan uji, metanol sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam.

Sebanyak 3 cawan petri yang sudah steril disiapkan. Nutrien agar yang sudah steril dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dan ditunggu hingga memadat. Suspensi bakteri sebanyak 100 µL dimasukkan pada permukaan agar menggunakan mikropipet dan diratakan menggunakan *spreader*. Sumuran dilakukan menggunakan coke bor sebanyak 5 lubang sumuran, 3 lubang

sumuran diisi dengan larutan uji dengan variasi waktu pengadukan (17,46; 32,46; dan 47,46 menit) dan 1 lubang sumuran untuk metanol sebagai kontrol positif, serta aquades sebagai kontrol negatif masing-masing sebanyak 100 μL . Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk diamati sebagai luas zona hambat.

3.4.8 Analisis Data

3.4.8.1 Penentuan Efisiensi dari Pembuatan Nanokapsul 2-Sitronelil Benzimidazol

Hasil dari pengukuran absorbansi dari masing – masing nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dengan variasi jumlah kasein dimasukkan ke dalam persamaan garis kurva baku. Persamaan garis yang diperoleh sebagai berikut :

$$y = ax + b$$

dimana y merupakan absorbansi dan x merupakan konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol.

Penentuan efisiensi dari nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol yaitu dengan perbandingan 2-sitronelil benzimidazol yang terenkapsulasi dengan total 2-sitronelil benzimidazol yang digunakan, yang dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{EE (\%)} = \frac{mx}{mo} \times 100\%$$

Dimana EE (%) merupakan efisiensi enkapsulasi 2-sitronelil benzimidazol, mx adalah jumlah 2-sitronelil benzimidazol yang terenkapsulasi dan mo jumlah 2-sitronelil benzimidazol total

3.4.8.2 Karakterisasi dengan FT-IR

Hasil pita serapan dari kasein hasil isolasi, nanokapsul blanko dan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol yang diperoleh dianalisis untuk mengetahui gugus fungsi spesifiknya. Kemudian dibandingkan satu sama lain.

3.4.8.3 Karakterisasi dengan PSA

Hasil dari karakterisasi menggunakan PSA, dapat diketahui distribusi ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol.

3.4.8.4 Karakterisasi dengan SEM

Hasil dari karakterisasi menggunakan SEM, dapat mengetahui morfologi permukaan dari nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol.

3.4.8.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan zona penghambatan dapat dihitung menggunakan persamaan berikut :

Zona hambat = $\frac{\text{diameter zona hambat pada beberapa sisi sumur} - \text{diameter sumuran}}$



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

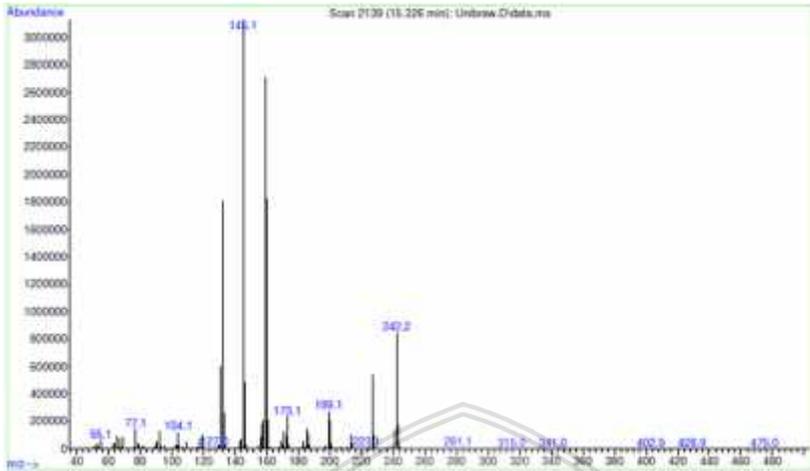
4.1 Identifikasi Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol

Senyawa 2-sitronelil benzimidazol yang digunakan merupakan hasil sintesis. Sehingga perlu dilakukan identifikasi dengan menggunakan GC-MS sebelum dienkapsulasi. Data kromatogram (TIC) dari hasil identifikasi 2-sitronelil benzimidazol seperti yang dilakukan oleh Karoma dalam skripsinya [43] ditunjukkan dalam **Gambar 4.1** dan **Gambar 4.2**



Gambar 4.1: Kromatogram 2-sitronelil benzimidazol

Berdasarkan hasil dari kromatogram tersebut diketahui bahwa hanya terbentuk satu komponen utama yang ditandai dengan adanya satu puncak dengan waktu retensi sebesar 15,339 menit yang menunjukkan keberadaan senyawa 2-sitronelil benzimidazol dengan kadar 100%. Rasio massa per muatan (m/z) dari spektra massa 2-sitronelil benzimidazol yaitu sebesar 242 yang merupakan puncak dasar terbentuknya senyawa 2-sitronelil benzimidazol dibuktikan dengan spektra massa sebagai berikut :



Gambar 4.2: Spektre massa 2-sitronelil benzimidazol

4.2 Isolasi Kasein dari Susu

Kasein yang digunakan untuk enkapsulasi merupakan hasil isolasi dari susu sapi. Protein utama dalam susu adalah kasein dan *whey* [26]. Kasein termasuk jenis phosphoprotein, terdiri dari beberapa unit asam amino yang terikat dengan ikatan peptida. Peptida kasein berbentuk amorf, aglomerat stabil yang dikenal sebagai kasein misel dalam kondisi yang sesuai [29]. Dalam kasein terdapat empat peptida yaitu s_1 , s_2 , dan . Peptida tersebut memiliki kecenderungan kuat untuk berasosiasi satu sama lain untuk membentuk kasein misel [34]. Kasein dapat diendapkan dengan asam, pada pH 4,6-4,8 kasein mengalami agregasi dan pengendapan[27]. Oleh karena itu, kasein dalam susu dapat dikoagulasikan atau digumpalkan oleh asam.

Kasein yang dihasilkan berdasarkan hasil isolasi dari susu berbentuk endapan dan berwarna putih tulang seperti yang disajikan dalam **Gambar 4.3**. Rendemen dan massa kasein yang diperoleh disajikan dalam **Tabel 4.1**. Berdasarkan hasil penelitian, isolat kasein yang diperoleh memiliki rendemen yang berbeda-beda. Susu dari berbagai sapi memiliki kandungan kasein yang berbeda pula [27].



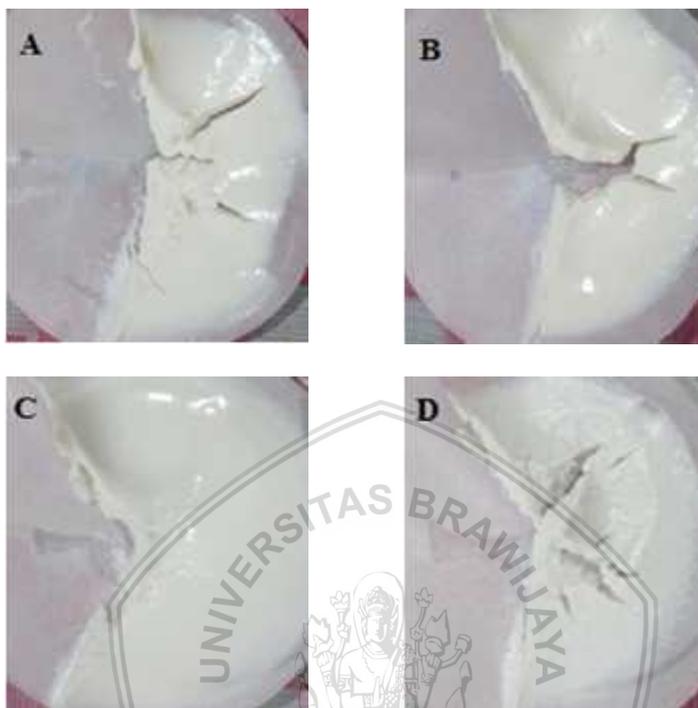
Gambar 4.3: Kasein hasil isolasi

Tabel 4.1: Rendemen isolasi kasein

Volume susu (ml)	Massa Kasein (g)	Rendemen (%)
100	6,63	6,40
100	5,26	5,10
100	4,81	4,70

4.3 Nanokapsul 2-Sitronelil Benzimidazol

Enkapsulasi didefinisikan sebagai proses di mana molekul bioaktif dikelilingi oleh lapisan, atau tertanam dalam matriks homogen maupun heterogen, untuk memberi kapsul kecil dengan banyak khasiat [5]. Enkapsulasi dalam partikel nanometrik merupakan alternatif yang bagus, karena dapat meningkatkan mekanisme penyerapan seluler, dapat meningkatkan aktivitas biologinya, disamping itu bisa memperbaiki kestabilan zat aktif [7–9]. Kasein misel dipilih sebagai penyalut dalam enkapsulasi 2-sitronelil benzimidazol karena terdiri dari α_1 -kasein, α_2 -kasein, β -kasein bersifat hidrofobik dan κ -kasein bersifat hidrofilik, serta mampu menggabungkan diri menjadi nanopartikel, disamping itu dilaporkan sebagai pembawa senyawa antimikroba yang ramah lingkungan [11–13]. Nanokapsul yang diperoleh dari hasil penelitian berupa padatan berwarna putih seperti yang terlihat pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4: Nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol

Keterangan : A = kasein 3 g B = kasein 4 g

C = kasein 5 g D = kasein 3 g

Pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dilakukan dengan variasi jumlah kasein, pada **Tabel 4.2** disajikan massa nanokapsul yang diperoleh dari masing-masing nanokapsul dengan jumlah kasein yang berbeda. Berdasarkan tabel tersebut, dapat dilihat massa nanokapsul semakin besar dengan bertambahnya jumlah kasein.

Tabel 4.2: Massa nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol

No	Sampel	Massa kasein	Massa nanokapsul (gram)
1	Nanokapsul A	3	9,27
2	Nanokapsul B	4	10,05
3	Nanokapsul C	5	12,47
4	Nanokapsul D	3	8,58

Keterangan : Nanokapsul D tanpa 2-sitronelil benzimidazol (Blanko)

4.4 Penentuan Efisiensi Nanokapsul dengan Spektrofotometer UV-Vis

Penentuan efisiensi bertujuan untuk mengetahui berapa besar konsentrasi bahan aktif yang dapat dienkapsulasi oleh kasein misel. Efisiensi yang dimaksud dalam penelitian ini ialah perbandingan antara konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol yang terenkapsulasi dengan konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol total. Untuk memisahkan nanokapsul dengan 2-sitronelil benzimidazol yang tidak terenkapsulasi dilakukan penyaringan dengan kertas saring, fultat yang diperoleh mengandung 2-sitronelil benzimidazol yang tidak terenkapsulasi. Efisiensi yang tinggi mengindikasikan bahwa bahan aktif cukup terenkapsulasi ke dalam penyalut, yang mana meningkatkan kestabilan terhadap oksidasi selama penyimpanan [45]. Analisis dilakukan pada panjang gelombang maksimum 2-sitronelil benzimidazol 280,8 nm. Kurva baku disajikan dalam **Lampiran C**. Hasil dari pengukuran efisiensi disajikan dalam **Tabel 4.3**

Tabel 4.3: Pengukuran efisiensi nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol

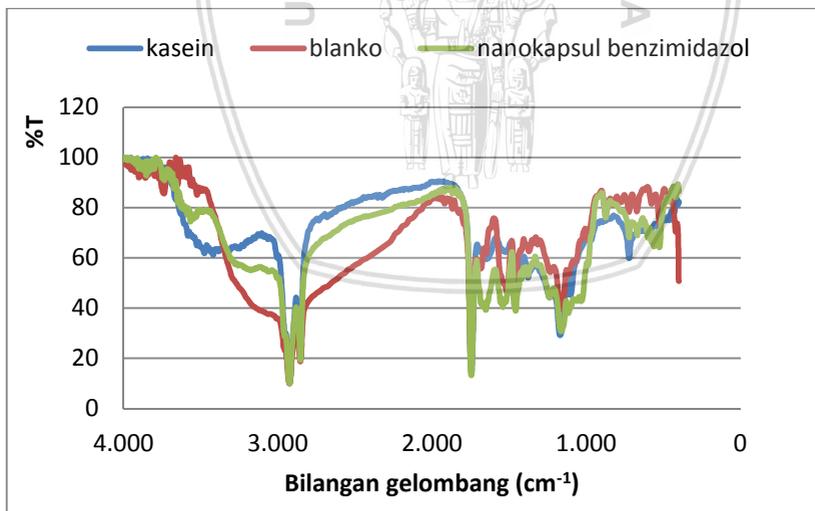
Sampel	Massa penyalut (g)	Konsentrasi yang disalutkan (ppm)	Konsentrasi yang tersalut (ppm)	%EE
Nanokapsul A	3	300	222,36	74,12%
Nanokapsul B	4	300	239,91	79,97%
Nanokapsul C	5	300	204,13	68,04%

Berdasarkan hasil pengukuran dapat diketahui konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol yang tersalut. Konsentrasi yang tersalut berbeda-beda pada masing-masing nanokapsul. Dengan massa penyalut 3, 4, dan 5 gram diperoleh konsentrasi yang tersalut berturut-turut sebesar 222,36 ; 239,91 ; 204,13 ppm. Selanjutnya dilakukan perhitungan efisiensi nanokapsul dan diperoleh persen efisiensi nanokapsul A, B, dan C masing-masing sebesar 74,12% ; 79,97% dan 68,04%. Hasil tersebut memungkinkan bahwa bagian kasein misel yang bersifat hidrofobik yang terletak pada sub misel mengikat 2-sitronelil benzimidazol.

4.5 Karakterisasi Nanokapsul

4.5.1 Karakterisasi dengan FT-IR

Karakterisasi dengan FT-IR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada nanokapsul yang dihasilkan. Karakterisasi dilakukan pada daerah serapan bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Spektra spektrofotometer IR dari isolat kasein, nanokapsul tanpa bahan aktif (blanko) dan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol ditampilkan dalam **Gambar 4.5**



Gambar 4.5: Spektra IR nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dibandingkan dengan blanko dan kasein.

Karakter dari kasein ditunjukkan adanya serapan vibrasi gugus CH_2 pada bilangan gelombang 2920 cm^{-1} dan 2850 cm^{-1} [46]. Vibrasi tersebut mengindikasikan adanya asam amino yang terdapat dalam kasein seperti leusin, isoleusin, glutamin, serine, prolin. Dalam penelitian ini serapan dari gugus CH_2 pada isolat kasein $2924,65\text{ cm}^{-1}$ dan $2853,29\text{ cm}^{-1}$, pada blanko $2926,57\text{ cm}^{-1}$ dan $2855,21\text{ cm}^{-1}$, dan pada nanokapsul benzimidazol $2924,65\text{ cm}^{-1}$ dan $2853,29\text{ cm}^{-1}$. Adanya serapan vibrasi dengan bilangan gelombang $1725\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) [46]. Dalam penelitian ini terdapat serapan dari gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) pada isolat kasein, blanko dan nanokapsul benzimidazol memiliki bilangan gelombang yang sama yaitu $1746,22\text{ cm}^{-1}$. Selain itu, juga terdapat serapan dari gugus OH pada isolat kasein $2400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, pada blanko $2400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, pada nanokapsul benzimidazol $2410\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$. Adanya gugus karbonil dan gugus OH dengan profil serapan yang sangat lebar, menggambarkan gugus karboksil yang terdapat pada asam amino dalam kasein. Dan juga terdapat serapan dari gugus amina (N-H) pada isolat kasein $3420,32\text{ cm}^{-1}$, pada blanko $3343,17\text{ cm}^{-1}$ pada nanokapsul benzimidazol $3202,37\text{ cm}^{-1}$.

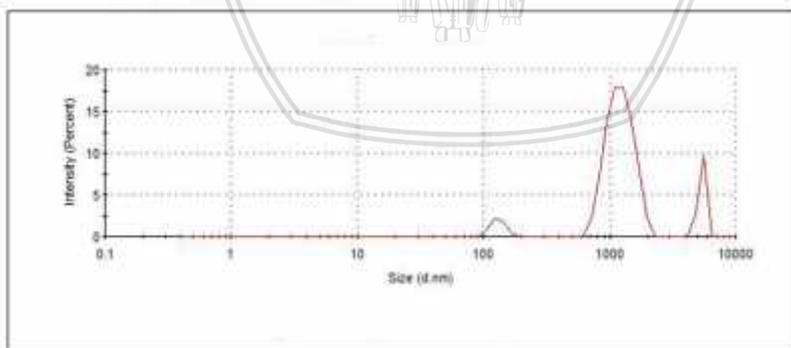
Berdasarkan **Gambar 4.5** pada spektra nanokapsul benzimidazol terdapat serapan dari gugus imina ($\text{C}=\text{N}$) yang merupakan karakter dari benzimidazol. Gugus imina ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $1651,72\text{ cm}^{-1}$. Sedangkan pada spektra isolat kasein dan blanko tidak terdapat serapan dari gugus imina. Dengan adanya serapan baru pada bilangan gelombang $1651,72\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan gugus imina dari benzimidazol menunjukkan jika benzimidazol sudah tersalut dalam kasein misel. Untuk mempermudah dalam menggolongkan serapan bilangan gelombang pada spektra akan ditabulasikan hasil analisis gugus fungsi dari spektra IR yang diperoleh, ditampilkan dalam **Tabel 4.4**

Tabel 4.4: Gugus fungsi dan bilangan gelombang nanokapsul benzimidazol terhadap isolat kasein dan blanko.

Gugus	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)		
	Kasein	Blanko	Nanokapsul benzimidazol
N-H amina	3420,32	3343,17	3202,37
C-H	2924,65	2926,57	2924,65
	2853,29	2855,21	2853,29
C=O	1746,22	1746,22	1746,22
C=C	1520,56	1516,71	1541,78
C=N	-	-	1651,72
OH	2400-3600	2400-3300	2410-3400

4.5.2 Karakterisasi dengan PSA

Karakterisasi dengan PSA digunakan untuk mengetahui ukuran serta distribusi ukuran partikel dari nanokapsul benzimidazol. Distribusi ukuran partikel nanokapsul yang dihasilkan ditampilkan dalam **Gambar 4.6** dan **Gambar 4.7**. Sedangkan hasil tabulasi ukuran partikel dalam **Tabel 4.5** ditunjukkan ukuran partikel dari nanokapsul blanko dan pada **Tabel 4.6** ditunjukkan ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol.

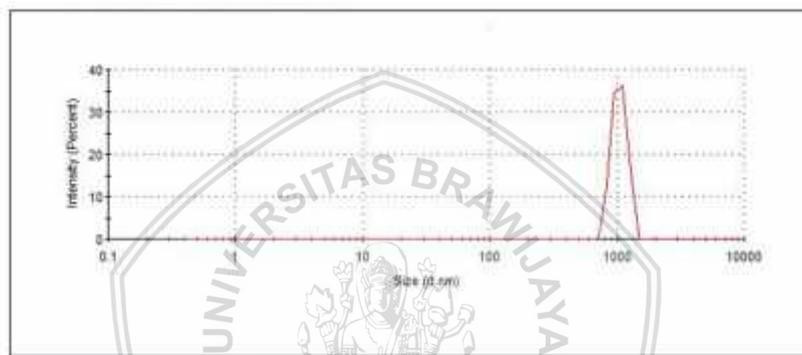


Gambar 4.6: Distribusi ukuran partikel nanokapsul tanpa 2-sitronelil benzimidazol (blanko)



Tabel 4.5: Ukuran partikel nanokapsul tanpa 2-sitronelil benzimidazol (blanko)

Ulangan	Ukuran (nm)	Standar deviasi (nm)	Intensitas (%)
1	1028	134,8	100
2	1279	361	69,80
3	1228	293	82,30



Gambar 4.7: Distribusi ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol

Tabel 4.6: Ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol

Ulangan	Ukuran (nm)	Standar deviasi (nm)	Intensitas (%)
1	984,7	174,1	100
2	1022	192,0	93,20
3	1047	139,4	100

Berdasarkan hasil penelitian, ukuran rata-rata dari nanokapsul blanko adalah 1178 nm, sedangkan ukuran rata-rata dari nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol adalah 1017 nm. Setelah dilakukan uji statistik dengan uji t *independent* menggunakan program SPSS 23 (**Lampiran E.3**), ukuran partikel nanokapsul blanko dan ukuran partikel nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol



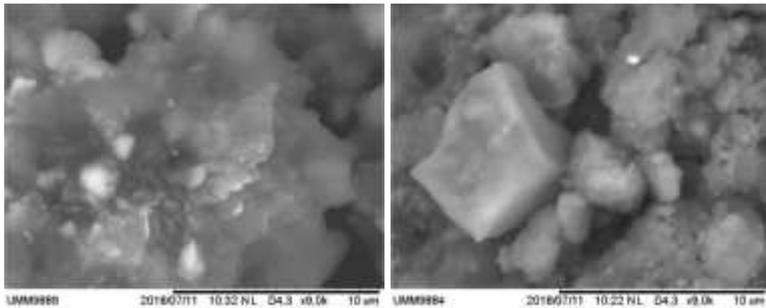
tidak ada perbedaan yang nyata. Dengan demikian, bahan aktif yang ditambahkan sudah masuk ke dalam penyalut sehingga ukuran yang dihasilkan tidak beda nyata.

Salah satu karakteristik mendasar nanokapsul adalah ukurannya, yang umumnya diambil sekitar 5-10 nm, dengan batas ukuran ~1000 nm, walaupun kisaran yang umumnya didapat adalah 100-500 nm [9]. Dalam definisi IUPAC nanopartikel merupakan partikel dengan ukuran antara 1-100 nm dengan lapisan antarmuka disekitarnya. Dari **Tabel 4.5** dan **Tabel 4.6** menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan masih cukup besar dan diatas 500 nm sehingga ukuran partikel yang diperoleh bisa dikatakan seminano. Dalam penelitian ini, dimungkinkan dengan dilakukannya *freeze drying* mengalami proses koagulasi dan ikatan yang terjadi semakin kuat, sehingga ukuran yang dihasilkan cukup besar. Penelitian yang dilakukan oleh Gora [47] melalui homogenisasi tekanan tinggi selama 2 siklus pada tekanan 500 dan 1000 bar diikuti dengan 5 siklus pada 1500 bar dihasilkan ukuran partikel sebelum dilakukan *freeze drying* lebih kecil dibandingkan setelah dilakukan *freeze drying*, yang sebelumnya memiliki ukuran rata-rata 190,5 nm menjadi 250,8 nm.

Kecepatan dan waktu pengadukan selama homogenisasi juga mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan. Seperti yang telah dilakukan oleh Li [48] mengatakan jika kecepatan dan waktu pengadukan memiliki pengaruh yang penting terhadap ukuran partikel. Kecepatan pengadukan tinggi dapat menghasilkan energi panas dalam sistem emulsi, yang mengarah ke peningkatan suhu, dan kemudian suhu tinggi menurunkan viskositas sistem dispersi untuk mendapatkan ukuran partikel yang lebih kecil. Kecenderungan serupa juga diamati untuk waktu pengadukan yang juga terkait dengan perubahan tegangan antarmuka dan viskositas, yang disebabkan oleh kecepatan tinggi yang diaduk.

4.5.3 Karakterisasi dengan SEM

Karakterisasi dengan SEM digunakan untuk melihat morfologi permukaan dari nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol dan nanokapsul blanko. Hasil dari karakterisasi ini disajikan dalam **Gambar 4.8**

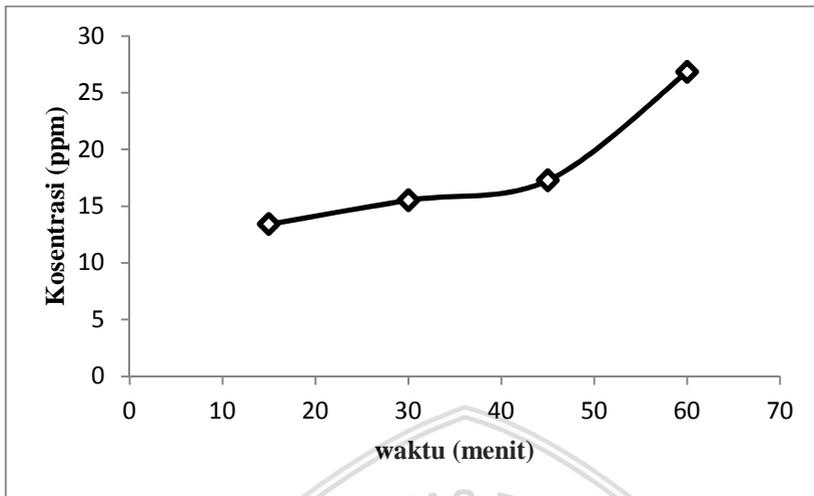


Gambar 4.8: Morfologi permukaan nanokapsul benzimidazol (kanan) dan blanko (kiri)

Nanokapsul yang telah dilakukan *freeze drying* dilakukan karakterisasi menggunakan SEM untuk mengetahui morfologi permukaan dari nanokapsul. Analisis dengan SEM dilakukan dengan perbesaran 9000x seperti yang terlihat pada **Gambar 4.8**. Berdasarkan hasil dari karakterisasi dengan SEM morfologi permukaan dari nanokapsul benzimidazol berbentuk trapesium dengan permukaan yang kasar dan tidak rata, sedangkan pada nanokapsul blanko berbentuk aglomerat dengan permukaan yang lebih halus. Dari penelitian Dalgleish [49] mengenai kemungkinan struktur kasein misel menggunakan *field-emission* SEM gambar yang dihasilkan menunjukkan permukaan misel tanpa lapisan, dan menunjukkan bahwa permukaan misel mungkin memiliki struktur yang jauh lebih kompleks, memiliki permukaan yang tidak halus dan mengandung celah diantara diantara sub struktur.

4.6 Profil Pelepasan Senyawa 2-Sitronelil Benzimidazol

Penentuan profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis dilakukan pada panjang gelombang maksimum 2-sitronelil benzimidazol 280,8 nm. Kurva baku disajikan dalam **Lampiran C**. Penentuan profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol dari penyalut dilakukan melalui pengadukan dengan magnetik stirer dalam waktu yang ditentukan dengan konsentrasi awal 2-sitronelil benzimidazol 29,81 ppm. Konsentrasi bahan aktif yang terlepas disajikan dalam **Lampiran C.3**. Berikut adalah profil pelepasan senyawa 2-sitronelil benzimidazol.



Gambar 4.9: Profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol

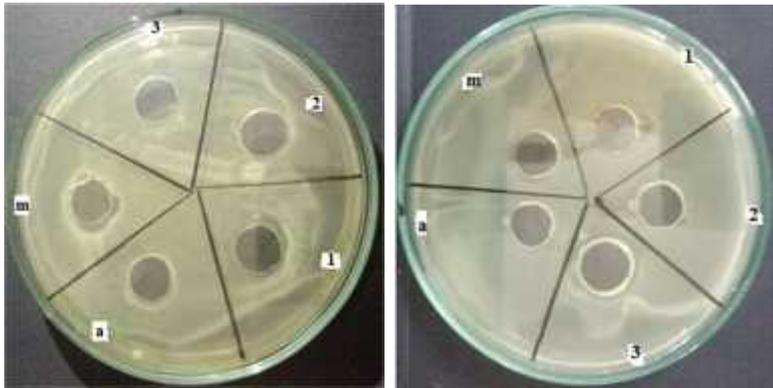
Gambar 4.9 menunjukkan hubungan antara konsentrasi terhadap waktu, dari gambar tersebut terlihat bahwa seiring bertambahnya waktu (lama pengadukan) konsentrasi 2-sitronelil yang terlepas meningkat. Pada waktu pengadukan 15 hingga 45 menit terjadi peningkatan konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol yang konstan, dan terjadi peningkatan yang signifikan pada waktu pengadukan 60 menit. Dengan lama pengadukan 60 menit 90% bahan aktif yang tersalut terlepas dari penyalut.

Pelepasan bahan aktif dari misel polimer dipengaruhi banyak faktor seperti panjang segmen polimer pembentuk inti, afinitas antara bahan aktif dengan inti, dan jumlah bahan aktif yang dimuat [50]. Kelarutan senyawa bioaktif juga menentukan laju dan sifat pelepasan dari sistem matriks polimer. Semakin larut suatu senyawa, semakin cepat laju pelepasan dan kinetika pelepasan akan semakin tinggi [51].

4.7 Uji aktivitas antibakteri

4.7.1 Penentuan zona hambat

Penentuan zona hambat dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Adanya aktivitas antibakteri ditandai dengan zona bening yang terbentuk. Zona hambat yang terbentuk pada berbagai media biakan bakteri disajikan dalam **Gambar 4.10**. Diameter zona hambat yang teramati diukur dengan menggunakan penggaris.



Gambar 4.10: Zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri *S.aureus* (kanan) dan *E.coli* (kiri)

Keterangan : a = air , m = metanol

1 = pengadukan 17,46 menit

2 = pengadukan 32,46 menit

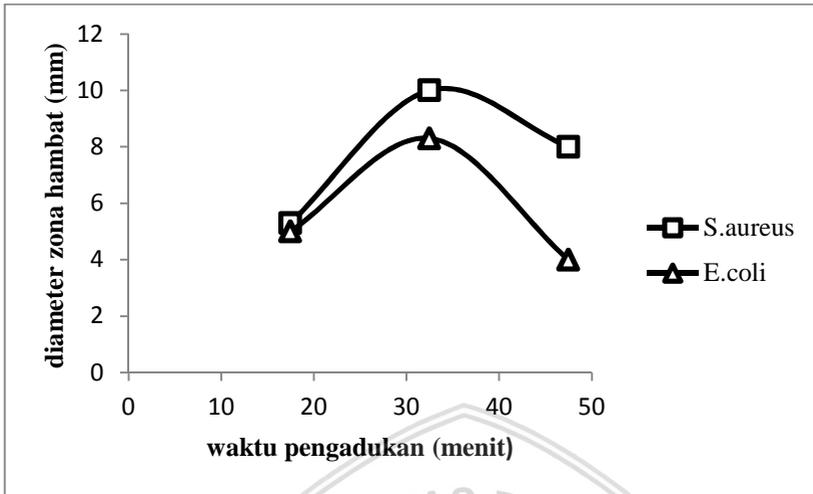
3 = pengadukan 47,46 menit

Pada **Tabel 4.7** disajikan diameter zona hambat yang terukur memiliki diameter yang berbeda-beda pada masing-masing larutan uji terhadap bakteri *E.coli*, dan *S.aureus* .

Tabel 4.7: Diameter zona hambat

Bakteri	Jumlah sel bakteri (CFU/ml)	Lama pengadukan (menit)	Diameter hambat (mm)
<i>S.aureus</i>	$8,4 \times 10^7$	17,46	5,3
		32,46	10
		47,46	8
<i>E.coli</i>	$7,8 \times 10^7$	17,46	5
		32,46	8,3
		47,46	4

Berdasarkan **Tabel 4.7** dibuat grafik seperti pada **Gambar 4.11** berikut ini :



Gambar 4.11: Diameter zona hambat

Diameter zona hambat paling besar ditunjukkan dalam menghambat bakteri *S.aureus*. Selanjutnya diikuti daya hambat terhadap bakteri *E.coli*. Pada bakteri *S. aureus* dan *E.coli* diameter zona hambat terbesar terjadi pada lama pengadukan 32,46 menit masing-masing 10 mm dan 8,3 mm. Menurut Davis and Stout dalam Karoma [43] kriteria daya hambat yang memiliki diameter zona hambat >20 mm (sangat kuat), 10-20 mm (kuat), 5-10 mm (sedang) dan <5 mm (lemah). Hasil penentuan zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* memberikan diameter zona hambat diantara 5-10 mm, maka memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong sedang terhadap bakteri *S. aureus* dan *E.coli*.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan lama pengadukan menggunakan magnetik stirer selama 47,46 menit, dan dibandingkan dengan lama pengadukan 32,46 dan 17,46 menit. Semakin lama pengadukan yang dilakukan, konsentrasi benzimidazol yang terlepas kemungkinan akan juga semakin besar. Namun dari diameter zona hambat yang dihasilkan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap bertambahnya konsentrasi bahan aktif yang terlepas. Menurut Elifah dalam Laili [42] diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan

kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Karoma [43] uji aktivitas antibakteri 2-sitronelil benzimidazol (diklorometana) dengan waktu inkubasi 24 jam terhadap bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 100, 300, dan 500 ppm dihasilkan diameter zona hambat masing-masing 6 mm, 8,3 mm dan 5 mm. Sedangkan terhadap bakteri *E. coli* masing-masing 12 mm, 9 mm, 11,67 mm. Jika dilihat dari konsentrasi yang digunakan, bila dibandingkan benzimidazol yang tidak dilakukan nanoenkapsulasi dengan benzimidazol yang dilakukan nanoenkapsulasi, meskipun pada akhirnya dilakukan pelepasan. Bisa dikatakan jika dilakukan nanoenkapsulasi dengan konsentrasi bahan aktif yang sedikit sudah memberikan zona hambat terhadap bakteri. Hal ini sesuai dalam Faridi [8] dengan nanoenkapsulasi dapat meningkatkan aktivitas biologinya karena adanya peningkatan rasio permukaan terhadap volume dengan mengurangi ukuran partikel menjadi nano.

Penelitian yang dilakukan oleh Harti, dkk [41] menyatakan jika pengujian aktivitas antibakteri metode difusi sumuran dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis media yang digunakan, jumlah inoculum bakteri, sifat mikrobia dan kelarutan senyawa uji. Jenis media mempengaruhi kemampuan tumbuh dari mikroba uji yaitu faktor sterilitas dan fertilitas media. Jumlah inoculum berkaitan dengan kepadatan sel 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.

Mekanisme suatu senyawa dalam menghambat bakteri diawali dengan cara merusak dinding sel. Perubahan komponen organik dan transportasi nutrisi yang mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap lapisan dinding sel bakteri. Setelah dinding sel bakteri rusak dilanjutkan dengan komponen aktif yang menembus lapisan dalam bakteri[52]. Komponen bioaktif dapat mengganggu dan mempengaruhi integrasi membran sitoplasma yang mengakibatkan kebocoran intraseluler sehingga menyebabkan lisis sel, dan denaturasi protein. Selain itu, juga bisa dengan cara menginaktivasi

enzim, mekanisme tersebut menunjukkan kerja enzim akan mengganggu dalam mempertahankan kelangsungan aktivitas mikroba sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energi dalam jumlah besar untuk mempertahankan kelangsungan aktivitasnya. Akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang dan aktivitas mikroba menjadi terhambat. Pertumbuhan bakteri akan berhenti jika kondisi tersebut berlangsung secara terus menerus[53].

Uji aktivitas penghambatan antibakteri terhadap bakteri gram positif (*S.aureus*) lebih kuat dibandingkan bakteri gram negatif (*E. coli*). Hal ini sesuai dengan sifat dinding sel bakteri tersebut. Menurut Pelczar dalam Lestari [54] struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dibandingkan struktur dinding sel bakteri gram positif. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang terdiri dari 3 lapisan yaitu, lapisan luar, lapisan tengah dan lapisan dalam. Sedangkan bakteri gram positif hanya mempunyai lapisan tunggal pada dinding selnya.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Penentuan efisiensi dari pembuatan nanokapsul 2-sitronelil benzimidazol menggunakan penyalut kasein misel menunjukkan persen efisiensi paling besar 79,97%
2. Ukuran rata-rata dari nanokapsul tanpa bahan aktif adalah 1178 nm, sedangkan ukuran rata-rata dari nanokapsul dengan bahan aktif adalah 1017 nm. Karakterisasi dengan FT-IR diperoleh spektra nanokapsul benzimidazol terdapat serapan dari gugus imina (C=N) yang merupakan karakter dari benzimidazol. Gugus imina ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $1651,72 \text{ cm}^{-1}$. Karakterisasi dengan SEM menunjukkan morfologi permukaan nanokapsul berbentuk trapesium dengan permukaan kasar dan tidak rata.
3. Profil pelepasan 2-sitronelil benzimidazol dari penyalut kasein misel pada waktu pengadukan 15 hingga 45 menit terjadi peningkatan konsentrasi 2-sitronelil benzimidazol yang konstan, dan terjadi peningkatan yang signifikan pada waktu pengadukan 60 menit.
4. Senyawa 2-sitronelil benzimidazol yang dilakukan nanoenkapsulasi dengan penyalut kasein misel memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, dan *E. coli* dengan diameter zona hambat masing- masing 10 mm, 8,3 mm

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, dengan alternatif lain yang diperlukan dalam proses nanoenkapsulasi. Serta menghindari terjadinya koagulasi dalam pembuatan nanokapsul.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kankeaw, U., & Rawanna, R. (2015). The Study of Antibacterial Activity of Benzimidazole Derivative Synthesized from Citronellal. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 5(5), 280–287. doi:10.1776/ijbbb.2015.5.5.280-287
2. Mavrova, A. T., Yancheva, D., Anastassova, N., Anichina, K., & Zvezdanovic, J. (2015). Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(19), 6317–6326. doi:10.1016/j.bmc.2015.08.029
3. Alasmay, F., Snelling, A., Zain, M., Alafeefy, A., Awaad, A., & Karodia, N. (2015). Synthesis and Evaluation of Selected Benzimidazole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Molecules*, 20(8), 15206–15223. doi:10.3390/molecules200815206
4. Mendez, A., & Vilas. (2013). *Microbial Pathogen and Strategies for Combining Them: Science, Technology and Education*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center.
5. Rodriguez, J., Martin, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41–59. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.032
6. Maryam, I., Huzaifa, U., Hindatu, H., & Zubaida, S. (2015). Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3), 165–170.
7. Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–14. doi:10.1155/2014/651593

8. Faridi Esfanjani, A., & Jafari, S. M. (2016). Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 532–543. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.06.053
9. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113–142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
10. Alexandru Mihai Grumezescu. (2016). *Encapsulations*. Bucharest: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-804307-3.00014-4
11. Rao, P. J., & Khanum, H. (2016). A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound - Curcumin. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 695–702. doi:10.1016/j.lwt.2015.08.070
12. Wang, T., Hu, Q., Zhou, M., Xia, Y., Nieh, M. P., & Luo, Y. (2016). Development of “all natural” layer-by-layer redispersible solid lipid nanoparticles by nano spray drying technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 273–285. doi:10.1016/j.ejpb.2016.07.022
13. Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M. D. C., Valente, A. J. M., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121(1), 94–101.
14. Herculano, E. D., de Paula, H. C. B., de Figueiredo, E. A. T., Dias, F. G. B., & Pereira, V. de A. (2015). Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 484–491. doi:doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.001
15. Penta, S. (2015). *Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives*. Raipur: Academic Press.

16. Salahuddin, Shaharyar, M., & Mazumder, A. (2017). Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 157–173. doi:10.1016/j.arabjc.2012.07.017
17. Sigma-aldrich. (2018). Safety Data Sheet. Retrieved from www.sigmaaldrich.com, diakses 11 Februari 2018
18. Sapri Ramadhan, D., Warsito, & Dhiaul Iftitah, E. (2018). *Microwave-assisted Synthesis of Benzimidazole Derivatives from Citronellal in Kaffir Lime (Citrus hystrix DC.) Oil. Material Science and Engineering*. Universitas Brawijaya, Malang. doi:10.1088/1757-899X/299/1/012076
19. Saberi, A. (2015). Efficient synthesis of Benzimidazols using zeolite, alumina and silica gel under microwave irradiation. *Iranian Journal of Science & Technology*, 39(1), 7–10.
20. Gurumeet C. Wadhawa, Vitthal S. Shivankar, Dinanath D. Patil, Yashwant A. Gaikwad, L. V. G. and C. H. G. (2016). Review on synthesis of benzimidazole using green protocol. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(9), 624–656.
21. Moreira, J. B., Mann, J., Neidle, S., McHugh, T. D., & Taylor, P. W. (2013). Antibacterial activity of head-to-head bis-benzimidazoles. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(4), 361–366. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.033
22. Kumar, K., Awasthi, D., Lee, S. Y., Cummings, J. E., Knudson, S. E., Slayden, R. A., & Ojima, I. (2013). Benzimidazole-based antibacterial agents against *Francisella tularensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(11), 3318–3326. doi:10.1016/j.bmc.2013.02.059
23. Padalkar, V. S., Borse, B. N., Gupta, V. D., Phatangare, K. R., Patil, V. S., Umape, P. G., & Sekar, N. (2016). Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-substituted benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, 1125–1130. doi:10.1016/j.arabjc.2011.12.006



24. Dos Santos, P. P., Flores, S. H., de Oliveira Rios, A., & Chiste, R. C. (2016). Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science and Technology*, *53*, 23–33. doi:10.1016/j.tifs.2016.05.005
25. Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Imran, M., Khan, S. U., Ihsan, A., Bokhari, H. (2016). Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Frontiers in Microbiology*, *7*(1580), 1–10.
26. R. Susanti dan E Hidayat. (2016). Profil Protein Susu dan Produk Olahannya. *Jurnal MIPA*, *39*(2), 98–106.
27. Glab, T. K., & Boraty ski, J. (2017). Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Topics in Current Chemistry*, *375*(71), 1–20. doi:10.1007/s41061-017-0158-z
28. Hooda, A., Mann, B., Sharma, R., & Bajaj, R. (2018). Characterization of Micellar Casein concentrate prepared from goat milk. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(2), 100–114.
29. Fox, P. F., & Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, *18*(7), 677–684. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.002
30. Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*, 73–83. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.002
31. De Sa Peixoto, P., Silva, J. V. C., Laurent, G., Schmutz, M., Thomas, D., Bouchoux, A., & Gésan-Guiziou, G. (2017). How High Concentrations of Proteins Stabilize the Amorphous State of Calcium Orthophosphate: A Solid-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of the Casein Case. *Langmuir*, *33*(5), 1256–1264. doi:10.1021/acs.langmuir.6b04235

32. Rebouillat, S., & Ortega-requena, S. (2015). Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products : A Review of the State-of-the-Art Available Data , Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6, 176–203. doi:10.4236/jbnb.2015.63018
33. Tuinier, R., & De Kruif, C. G. (2002). Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117(3), 1290–1295. doi:10.1063/1.1484379
34. Sharma, M., Mann, B., Sharma, R., Bajaj, R., Athira, S., Sarkar, P., & Pothuraju, R. (2017). Sodium caseinate stabilized clove oil nanoemulsion: Physicochemical properties. *Journal of Food Engineering*, 212, 38–46. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.05.006
35. Haham, M., Ish-Shalom, S., Nodelman, M., Duek, I., Segal, E., Kustanovich, M., & Livney, Y. D. (2012). Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food & Function*, 3(7), 737–744. doi:10.1039/c2fo10249h
36. Sahlan, M., & Supardi, T. (2013). Encapsulation Of Indonesian Propolis By Casein Micelle. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), 297–305.
37. McCluskey, M. (2017). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed.). Washington: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12148-1
38. Sitorus, M. (2009). *Spektroskopi Elusidasi Struktur Molekul Organik*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
39. Horiba Scientific. (2017). *A Guidebook to Particle Size Analysis*. Irvine: Horiba Instrument, Inc. Retrieved from https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf%0Ahttps://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/.../PSA_Guidebook.pdf
40. Amidon, G. E., Meyer, P. J., & Mudie, D. M. (2016). *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition* (2nd ed.). United States: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802447-8.00010-8

41. Harti, A. S., Akupuntur, J., & Kesehatan, P. (2012). Perbandingan Uji Aktivitas Anti Bakteri Chitooligosakarida Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Salmonella typhi* Secara in vitro. STIKes Kusuma Husada, Surakarta
42. Laili, A. N. I. (2017). *Studi Perbandingan Aktivitas Antibakteri Mikrokapsul Minyak Jeruk Purut (Citrus hystrix D. C) Kulit Buah, Daun dan Fraksi terhadap Bakteri Staphylococcus aureus* (Skripsi). Universitas Brawijaya, Malang
43. Karoma, D. Al. (2018). *Pengaruh Penggunaan Pelarut Metanol dan Diklorometana dalam Derivatisasi Sitronelal menjadi Benzimidazol dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri* (Skripsi). Universitas Brawijaya, Malang
44. Sahlan, M., & Pramadewi, I. (2012). Nanoencapsulation of the flavonoids isolated from *Phaleria macrocarpa* leaf by Casein micelle. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(3), 472–478.
45. De Campo, C., dos Santos, P. P., Costa, T. M. H., Paese, K., Guterres, S. S., Rios, A. de O., & Flôres, S. H. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 234, 1–9. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.153
46. Sirocic, A. P., & Krehula, L. K. (2016). Characterization of Casein Fractions – Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow ' s Milk. *Biochemistry*, 30(4), 501–509. doi:10.15255/CABEQ.2015.2311
47. Gora, S., Mustafa, G., Sahni, J. K., & Ali, J. (2016). Nanosizing Of Valsartan by High Pressure Homogenization to Produce Dissolution Enhanced Nanosuspension : Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Study. *Drug Deliv*, 23(3), 930–940. doi:10.3109/10717544.2014.923066
48. Li, X., Wang, L., & Wang, B. (2017). Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 479–486. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.051

49. Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Douglas Goff, H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, *14*(12), 1025–1031. doi:10.1016/j.idairyj.2004.04.008
50. Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., & Yadav, S. K. (2014). Review article: Nanoencapsulation For Drug Delivery. *Experimental and Clinical Science Journal*, *13*, 265–286.
51. Lazim, N. A. M., & Muhamad, I. I. (2017). Encapsulation of Vitamin E using maltodextrin/Sodium Caseinate/Selenomethionine and its release study. *Chemical Engineering Transactions*, *56*, 1951–1956. doi:10.3303/CET1756326
52. Permadani, I. A., Surjowardojo, P., & Sarwiyono. (2014). Daya Hambat Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Menggunakan Pelarut Etanol Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Penyebab Mastitis Pada Sapi Perah. Universitas Brawijaya, Malang.
53. Rahmawati, N., Sudjarwo, E., & Widodo, E. (2014). Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu-ilmu Peternakan*, *24*(3), 24–31.
54. Lestari, Y., Ardiningsih, P., & Nurlina. (2016). Aktivitas Antibakteri Gram Positif Dan Negatif dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, *5*(4), 1–8.