



**SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA
1-ALIL-3-(4-KLOROBENZOIL) TIUREA TERHADAP BAKTERI
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :

Kadek Devi Arum Savitri

NIM 165070507111010

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

2020

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA
1-ALIL-3-(4-KLOROBENZOIL) TIUREA SECARA IN VITRO TERHADAP
BAKTERI *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Oleh:

Kadek Devi Arum Savitri

NIM 165070507111010

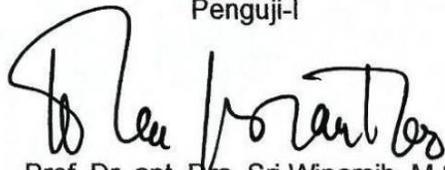
Telah diuji pada

Hari: Kamis

Tanggal: 9 Juli 2020

Dan dinyatakan lulus oleh:

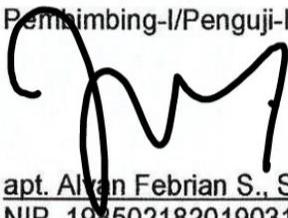
Penguji-I



Prof. Dr. apt. Dra. Sri Winarsih, M.Si

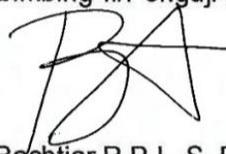
NIP. 195408231981032001

Pembimbing-I/Penguji-II



apt. Alvan Febrian S., S. Farm., M. Farm.
NIP. 198502182019031007

Pembimbing-II/Penguji-III



apt. Bachtiar R.P.I., S. Farm., M. Farm.
NIP. 198709292019031007

Mengetahui,

plh. Ketua Program Studi Sarjana Farmasi
Koordinator Pendidikan
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



apt. Oktavia Eka Puspita, S.Farm., M.Sc.

NIK. 20110685102520001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kadek Devi Arum Savitri
 NIM : 165070507111010
 Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran
 Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 15 Juli 2020

Yang membuat pernyataan,



(Kadek Devi Arum Savitri)

NIM. 165070507111010

**ABSTRAK**

Savitri, Kadek Devi Arum. 2020. **Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-Alil-3-(4-Klorobenzoil)Tiourea terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923.** Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) apt. Alvan Febrian Shalas S. Farm., M. Farm. (2) apt. Bachtiar Rifai P. I, S.Farm., M.Farm.

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan kematian (*mortality*) di negara berkembang seperti Indonesia. Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen yang bersifat sangat dinamis. Salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi yakni *Staphylococcus aureus*. Pengembangan senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri dapat menjadi salah satu solusi. Pendekatan pengembangan antibakteri baru dapat dilakukan dengan menggunakan desain analog baru melalui proses sintesis. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa turunan benzoiltiourea, 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea sebagai senyawa penuntun antibakteri baru dan mengetahui aktifitas antibakteri enyawa tersebut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses sintesis dilakukan dengan metode Scoutten Baumann melalui reaksi substitusi nukleofilik. Setelah disintesis dilakukan uji konfirmasi struktur dengan Spektrofotometri UV, Infra-Red, NMR, dan Spektroskopi Massa. Kontrol positif dan negatif yang digunakan yaitu antibiotik gentamisin dan Tween 80 dengan konsentrasi 0,4%. Metode pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi agar. Hasil penelitian menunjukkan senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik dengan metode *Schotten-baumann*, namun senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea tidak memiliki aktifitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan antibiotik gentamisin.

Kata kunci: Sintesis, Benzoiitiourea, Antibakteri, *Staphylococcus aureus*

**ABSTRACT**

Savitri, Kadek Devi Arum. 2020. **Synthesis and Antibacterial Activity Test of 1-Allyl-3- (4-Chlorobenzoyl) Thiourea in Staphylococcus Aureus ATCC 25923.** Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisor: (1) apt. Alvan Febrian Shalas S. Farm., M. Farm. (2) apt. Bachtiar Rifai P. I, S. Farm., M. Farm.

Infectious disease is one of the causes of high morbidity and mortality in developing countries such as Indonesia. Infection is a disease caused by very dynamic pathogenic microbes. One of the bacteria that often-caused infection is *Staphylococcus aureus*. The development of an agent that has potential as antibacterial can be one of the solutions. A new antibacterial development approach can be carried out by carrying out a new analog design through a synthesis process. This study aims to obtain the benzoyl thiourea derivative, 1-allyl 3- (4-chlorobenzoyl) thiourea as a new antibacterial agent and determine the antibacterial activity of its compound against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The synthesis step was done by nucleophilic substitution (benzoylation) on allylthiourea compound via modified Schotten-Baumann reaction. Chemical structure analysis was evaluated by means of Infra-Red, Nuclear Magnetic Resonance, and Mass Spectroscopy methods. Positive and negative controls used were antibiotics gentamicin and Tween-80 with a concentration of 0.4%. The method for testing antibacterial activity uses the agar dilution method. The results showed 1-allyl 3- (4-chlorobenzoyl) thiourea could be synthesized through nucleophilic substitution reaction with Schotten-Baumann, and 1-allyl-3- (4-chlorobenzoyl) thiourea had no better antibacterial activity compared with gentamicin.

Keywords: Synthesis, Benzoilthiourea, Antibacterial, *Staphylococcus aureus*



DAFTAR ISI

Judul.....i

Lembar Pengesahan.....ii

Pernyataan Keaslian Tulisan.....iii

Kata Pengantar.....iv

Abstrak.....vi

Abstract.....vii

Daftar Isi.....viii

Daftar Tabel.....xii

Daftar Gambar.....xiii

Daftar Lampiran.....xv

Daftar Singkatan.....xvi

BAB 1. PENDAHULUAN.....1

1.1. Latar Belakang.....1

1.2. Rumusan Masalah.....6

1.3. Tujuan.....7

1.3.1. Tujuan Umum.....7

1.3.2. Tujuan Khusus.....7

1.4. Manfaat.....7

1.4.1. Manfaat Akademik.....7

1.4.2. Manfaat Praktis.....7

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....8

2.1 Infeksi.....8

2.1.1 *Staphylococcus aureus*.....9



2.1.1.1 Karakteristik Umum	9
2.1.1.2 Manifestasi Klinis	10
2.1.1.3 Patogenesis	11
2.2 Antibiotik	11
2.2.1 Aminoglikosida	12
2.3 Resistensi Antibiotik	14
2.4 Sintesis	16
2.4.1 Substitusi Nukleofilik	17
2.4.2 <i>Schotten Baumann</i>	18
2.5 Tiourea	20
2.5.1 Tiourea sebagai Antibakteri	20
2.6 Uji Kemurnian	22
2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	22
2.6.2 Uji Rentang Titik Lebur	23
2.7 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis	24
2.7.1 Spektrofotometri Inframerah (IR)	24
2.7.2 Spektrofotometri ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR	26
2.7.3 Spektrometri Massa	28
2.7.4 Spektrofotometri Ultra Violet (UV)	30
2.8 Uji Antibakteri	32
2.8.1 Metode Difusi	32
2.8.1.1 Difusi Agar-Cakram	32
2.8.1.2 Gradien Antimikroba (<i>E-test</i>)	33
2.8.1.3 Difusi Agar-Sumuran	35
2.8.1.4 Difusi Agar-Plug	35
2.8.2 Metode Dilusi	36
2.8.2.1 Dilusi Kaldu (<i>Broth Dillution</i>)	36
2.8.2.2 Dilusi Agar (<i>Agar Dillution</i>)	38
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	40
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	40



3.2 Hipotesis penelitian	43
--------------------------------	----

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	45
--------------------------------	----

4.2 Subjek Penelitian	45
-----------------------------	----

4.3 Variabel Penelitian	45
-------------------------------	----

4.4 Lokasi dan waktu penelitian	46
---------------------------------------	----

4.5 Bahan dan Alat	46
--------------------------	----

4.5.1 Bahan	46
-------------------	----

4.5.2 Alat	46
------------------	----

4.6 Definisi Operasional	47
--------------------------------	----

4.7 Prosedur Penelitian	47
-------------------------------	----

4.7.1 Sintesis senyawa	48
------------------------------	----

4.7.2 Uji Kemurnian	49
---------------------------	----

4.7.2.1 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	49
--	----

4.7.2.2 Uji Titik Lebur	49
-------------------------------	----

4.7.3 Uji Konfirmasi Struktur	49
-------------------------------------	----

4.7.3.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri UV	49
--	----

4.7.3.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Infrared	50
--	----

4.7.3.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan	
--	--

$^{13}\text{C-NMR}$	50
---------------------------	----

4.7.3.4 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa	50
---	----

4.7.4 Uji Antibakteri Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea	51
--	----

4.7.4.1 Identifikasi Bakteri	51
------------------------------------	----

4.7.4.1.1 Pewarnaan Gram	51
--------------------------------	----

4.7.4.1.2 Uji Katalase	52
------------------------------	----

4.7.4.1.3 Uji Koagulase	52
-------------------------------	----

4.7.4.2 Preparasi Kultur Bakteri	53
--	----

4.7.4.3 Preparasi Larutan Uji dan Kontrol	54
---	----

4.7.4.3.1 Sampel Uji	54
----------------------------	----

4.7.4.3.2 Kontrol Positif (+)	54
-------------------------------------	----



4.7.4.3.3	Kontrol Negatif (+)	55
4.7.4.4	Uji Dilusi Agar	55
4.8	Analisis Data	55
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		
5.1	Hasil Penelitian	57
5.1.1	Sintesis Senyawa BATU-4	57
5.1.2	Uji Kemurnian Senyawa BATU-4	58
5.1.3	Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-4	59
5.1.4	Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa BATU-4	66
BAB 6. PEMBAHASAN		
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian	70
6.1.1	Sintesis Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea	70
6.1.2	Uji Kemurnian Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea	71
6.1.3	Uji Konfirmasi Struktur Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea	72
6.1.4	Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea	75
6.2	Implikasi terhadap bidang Kefarmasian	80
6.3	Keterbatasan Penelitian	81
BAB 7. PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	82
7.2	Saran	82
DAFTAR PUSTAKA		
Lampiran		88



DAFTAR TABEL

5.1 Persen Rendemen BATU-4 56

5.2 Ciri Organoleptis BATU-4 56

5.3 Uji Rentang Titik Lebur BATU-4 58

5.4 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-4 60

5.5 Interpretasi Spektra ¹H-NMR Senyawa BATU-4 61

5.6 Interpretasi Spektra ¹³C-NMR Senyawa BATU-4 62

5.7 Interpretasi Spektra Spektrofotometri Massa Senyawa BATU-4 64

5.8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Sampel Uji pada *Plate* 67

5.9 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Perlakuan Kontrol pada *Plate* 68



DAFTAR GAMBAR

2.1 Kriteria Interpretasi Sensitivitas untuk Gentamisin	14
2.2 Reaksi Substitusi Nukleofilik	18
2.3 Reaksi <i>Schotten-Baumann</i>	18
2.4 Reaksi <i>Schotten-Baumann</i>	19
2.5 Tiourea dan Urea	20
2.6 Campuran A dan B diadsorpsi pada fase diam; Representasi skematis prinsip pemisahan KLT	23
2.7 Media kultur, Ukuran inokulum mikroba dan kondisi inkubasi untuk metode uji kerentanan antimikroba	33
2.8 Metode Difusi Agar	36
2.9 Persiapan inokulum mikroba 0.5 <i>McFarland</i>	37
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	40
4.1 Prosedur Penelitian	47
4.2 Prosedur Sintesis Senyawa 1-alil-3-(4-kloro)benzoiltiourea	48
4.3 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT	49
4.4 Prosedur Uji Rentang Titik Lebur	49
4.5 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri UV	49
4.6 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR	50
4.7 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Magnet Inti	50
4.8 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa	50
4.9 Prosedur Pewarnaan Gram	51
4.10 Prosedur Uji Koagulase	52
4.11 Prosedur Uji Katalase	52
4.12 Prosedur Preparasi Bakteri	52
4.13 Prosedur Kultur Bakteri	53
4.14 Prosedur Preparasi Sampel Uji	53
4.15 Prosedur Preparasi Kontrol Positif	54
4.16 Prosedur Preparasi Kontrol Negatif	54



4.17	Prosedur Uji Dilusi Agar	55
5.1	Kristal BATU-4	57
5.2	Uji KLT BATU-4	57
5.3	Spektra UV BATU-4	59
5.4	Spektra Inframerah Senyawa BATU-4	60
5.5	Spektra ¹ H-NMR Senyawa BATU-4	61
5.6	Spektra ¹³ C-NMR Senyawa BATU-4	62
5.7	Kromatografi Senyawa BATU-4	63
5.8	Spektra Spektroskopi Massa Senyawa BATU-4	64
5.9	Pewarnaan Gram	65
5.10	Uji Katalase	66
5.11	Uji Koagulase	66



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Jumlah Bahan untuk Sintesis 88

Lampiran 2. Perhitungan Hasil Sintesis 88

Lampiran 3. Surat Bukti Kelayakan Etik 89

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Uji Antibakteri 90

Lampiran 5. Dokumentasi Proses Sintesis dan KLT 91

Lampiran 6. Dokumentasi Uji Kemurnian KLT 92

Lampiran 7. Dokumentasi Uji Kemurnian Rentang Titik Lebur 93

Lampiran 8. Spektra UV 94

Lampiran 9. Spektra IR 95

Lampiran 10. Spektra ¹H-NMR 96

Lampiran 11. Spektra ¹³C-NMR 97

Lampiran 12. Spektra LC-MS 98

Lampiran 13. Dilusi Agar 99

Lampiran 14. Surat Keterangan *Strain* Kuman 105



DAFTAR SINGKATAN

FTIR *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

IR *Infrared*

KLT *Kromatografi Lapis Tipis*

KHM *Kadar Hambat Minimum*

MS *Mass Spectroscopy*

MIC *Minimum Inhibitor Concentration*

NMR *Nuclear Magnetic Resonance*

UV *Ultra Violet*

SN *Substitusi Nukleofilik*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan kematian (*mortality*) terutama pada negara berkembang seperti Indonesia. Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen yang bersifat sangat dinamis (Kumar *et al.*, 2012). Meskipun tidak sebesar penyakit tidak menular, Indonesia masih memiliki tantangan dari kasus penyakit menular yang meningkat setiap tahunnya. Pada 2015 sebanyak 30.935 kasus, 2016 tercatat 41.250 kasus dan 2017 tercatat 48.300 kasus. Tak hanya itu, ancaman pada penyakit infeksi juga muncul dari beberapa penyakit infeksi yang dapat menimbulkan pandemi antara lain SARS, Poliomyelitis, H1N1, Ebola, MERS-CoV, Difteri serta TB RO (Riskesmas, 2018).

Salah satu contoh bakteri yang dapat menyebabkan terjadinya infeksi adalah *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* yang merupakan salah satu penyebab paling sering akan terjadinya infeksi yang didapat di rumah sakit. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif yang bersifat anaerob fakultatif, yang dapat menyebabkan kolonisasi dan infeksi pada berbagai organ, biasanya terdapat pada saluran pernapasan atas dan kulit (Gnanamani *et al.*, 2017). Infeksi serius akan terjadi ketika resistensi inang melemah karena adanya perubahan hormon, adanya penyakit, luka, ataupun menggunakan steroid dan obat lain yang memengaruhi imunitas sehingga terjadi pelemahan inang (Bien *et al.*, 2011).



Infeksi bakteri dapat dicegah dan diobati menggunakan obat antibakteri atau yang disebut antibiotik. Antibiotik merupakan zat biokimia baik alami maupun sintetik yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, yang toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Kemampuan antibiotik dalam mengatasi dan mencegah penyakit infeksi menyebabkan penggunaannya mengalami peningkatan. Akibatnya terjadi perkembangan bakteri yang resisten terhadap antibiotik (Etebu dan Ibemologi, 2016). Resistensi terjadi ketika bakteri berubah dalam satu atau lain hal yang menyebabkan turun atau hilangnya efektivitas obat. MENKES RI mengeluarkan pedoman No. 2406/MENKES/PER/XII/2011 mengenai penggunaan antibiotik dan prinsip pencegahan mikroba resisten melalui peningkatan ketaatan terhadap prinsip-prinsip kewaspadaan standar. Namun, sebagian masyarakat masih menggunakan antibiotik secara tidak rasional, tidak berdasarkan indikasi dan terdapat kecenderungan antibiotik dibeli bebas atau tanpa resep dokter (Kumar *et al.*, 2012).

Infeksi yang disebabkan bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik sudah merupakan masalah yang terjadi secara global. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* merupakan contoh strain *S. aureus* yang telah resisten terhadap aktivitas antibiotik golongan β -laktam dan antibiotik non- β -laktam, yang kejadiannya telah meningkat di banyak negara. Resistensi antibiotik menimbulkan beberapa konsekuensi yang fatal, dapat mengakibatkan perpanjangan penyakit (*prolonged illness*), meningkatnya resiko kematian (*greater risk of death*) dan semakin lamanya masa rawat inap di rumah sakit (*length of stay*). Hal ini menunjukkan bahwa resistensi antimikroba merupakan masalah yang harus segera diatasi (Kumar *et al.*, 2012).



Pengembangan senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri dapat menjadi salah satu solusi. Pendekatan pengembangan antibakteri baru dapat dilakukan dengan melakukan desain analog baru, mengombinasi senyawa obat, maupun dengan agen terapi baru, dengan mekanisme yang belum pernah digunakan sebelumnya (Glory *et al.*, 2016). Sintesis dapat menjadi salah satu upaya pengembangan obat baru yang memiliki efektifitas yang lebih baik dan toksisitas yang lebih rendah, melalui memodifikasi struktur senyawa (Siswandono, 2014). Modifikasi struktur dapat mempengaruhi aktivitas biologis dari suatu senyawa melalui modifikasi efek elektronik, lipofilisitas, dan sterik (Arslan *et al.*, 2009). Melalui proses sintesis turunan senyawa ini diharapkan dapat menghasilkan senyawa yang memiliki efek antimikroba yang lebih baik.

Senyawa turunan tiourea diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antibakteri, antijamur, antitiroid, antivirus, antikanker, antikonvulsan, analgesik, anti-inflamasi, antiangiogenik, juga sering digunakan pada bidang pertanian sebagai insektisida. Karena memiliki banyak fungsi, sintesis senyawa tiourea dan turunannya banyak dilakukan (Kamalulazmy, 2016). Menurut Halim dan Zainab (2016), turunan tiourea memiliki potensi sebagai prekursor yang cocok untuk berbagai sintesis senyawa baru, dikarenakan memiliki dua gugus amina primer yang reaktif. Pada penelitian ini, digunakan bis(tiourea) yang diperkirakan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibanding turunan monotiourea, dikarenakan keberadaan dua gugus tiourea. Turunan Bis(tiourea) (2a-c) disubstitusi dengan rantai alkil C_{10} , C_{12} , dan C_{14} . Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai Kadar Hambar Minimum (KHM) turunan Bis(tiourea) 2a dan 2b dengan substitusi C_{10} dan C_{12} masing-masing $135\mu\text{g/mL}$ dan



145 μ g/mL, yang menunjukkan hasil yang cukup baik, jika dibandingkan dengan antibiotik pembanding ampisilin sebesar 108 μ g/mL. Penambahan rantai alkil dikatakan dapat meningkatkan lipofilisitas dan aktivitas biologis senyawa turunan tiourea. Di sini peneliti akan berfokus pada aktivitas antibakteri dari senyawa turunan benziltiourea 1-*alil*-3-(4-klorobenzoil)tiourea, dengan metode sintesis *Schotten-Baumann*.

Metode sintesis *Schotten-Baumann* merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida, dengan adanya penambahan basa yang digunakan untuk menghasilkan ekuilibrium dalam pembentukan amida dari amina dan asam klorida, yang dimodifikasi melalui reaksi substitusi nukleofilik (*benzoilasi*) (Wang, 2010). Penambahan ikatan tidak jenuh berupa alil dimungkinkan dapat meningkatkan aktivitas biologis senyawa melalui interaksi yang lebih baik antara senyawa dengan gugus-gugus pada konstituen sel reseptor. Penambahan gugus halogen yang merupakan gugus penarik elektron, akan meningkatkan sifat elektronik senyawa sehingga memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor, selain itu gugus halogen juga memiliki tiga efek utama yaitu efek sterik, elektronik, dan obstructif, sehingga diharapkan dapat menyebabkan perubahan aktivitas biologis (Budiyati, 2010). Penambahan gugus 4-klorobenzoil yang diperoleh dari turunan benzoil klorida merupakan senyawa yang diharapkan dapat memperpanjang durasi aktivitas dan meningkatkan sifat elektronik senyawa

Berdasarkan penelitian terdahulu cara ini dipilih karena dianggap lebih efisien dengan reaksi yang hanya berlangsung satu tahap dan telah digunakan untuk sintesis senyawa benzoiltiourea dan turunannya. Hasil sintesis diuji kemurniannya dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan dikonfirmasi struktur



senyawa menggunakan metode spektrofotometri IR, spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, spektrofotometri UV dan spektrometri massa. Setelah tahap konfirmasi struktur selesai, proses dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode dilusi agar.

Metode dilusi agar merupakan metode yang melibatkan penggabungan berbagai konsentrasi yang diinginkan dari antimikroba ke dalam media agar (cair), umumnya menggunakan pengenceran dua-seri, yang diikuti dengan inokulasi inokulum mikroba pada permukaan plat agar. Metode dilusi adalah metode yang paling tepat untuk penentuan nilai KHM, karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media *broth* (makrodilusi atau mikrodilusi). Nilai KHM yang dicatat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$ atau mg/L (Balouiri *et al*, 2016).

Pada penelitian ini digunakan antibiotik pembanding gentamisin, golongan aminoglikosida. Gentamisin bekerja dengan berikatan dengan ribosomal subunit 30s dan 50s pada bakteri dan menghambat sintesis proteinnya sehingga terjadi kerusakan pada membran sel bakteri. Gentamisin efektif terhadap bakteri gram-positif seperti spesies *Staphylococcus* dan beberapa bakteri gram negatif (Katzung, 2010). Menurut USP (2013), penggunaan Gentamisin sebagai kontrol positif terhadap bakteri memiliki nilai KHM sebesar 0,12 – 1 mcg/mL. Dilihat dari nilai KHM yang ≥ 4 mcg/mL maka dikatakan antibiotik gentamisin sensitif (*susceptible*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (FDA, 2013).



Berdasarkan latar belakang di atas, dirancang penelitian untuk mengembangkan senyawa turunan turunan benziltiourea sebagai antibakteri yang diharapkan memiliki aktivitas yang lebih baik dari obat antibakteri yang telah beredar.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea dengan 4-klorobenzoilklorida?

1.2.2 Apakah senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibanding dengan antibiotik gentamisin?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan senyawa turunan benzoiltiourea, 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea sebagai senyawa penuntun antibakteri baru dan mengetahui aktifitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Memperoleh senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea dengan 4-klorobenzoilklorida.

1.3.2.2 Membandingkan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil)tiourea dengan



antibiotik gentamisin secara *in vitro* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode mikrodilusi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Manfaat akademik yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat menjadi dasar dan potensi bagi penelitian-penelitian selanjutnya mengenai sintesis senyawa turunan benzoiltiourea sebagai antibakteri.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah sebagai dasar pengembangan penelitian untuk mendapatkan senyawa penuntun obat antibakteri yang baru terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infeksi

Penyakit infeksi merupakan penyakit menular yang mudah menyerang anak maupun dewasa, karena sistem imun tubuh yang kurang baik. Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang bersifat sangat dinamis, seperti bakteri, virus, parasit atau jamur; penyakit dapat menyebar, langsung atau tidak langsung, dari satu orang ke orang lain (Kumar *et al.*, 2015). Meskipun tidak sebesar penyakit tidak menular, Indonesia masih memiliki tantangan dari kasus penyakit menular yang meningkat setiap tahunnya. Pada 2015 sebanyak 30.935 kasus, 2016 tercatat 41.250 kasus dan 2017 tercatat 48.300 kasus. Tak hanya itu, ancaman pada penyakit infeksi juga muncul dari beberapa penyakit infeksi yang dapat menimbulkan pandemi antara lain SARS, Poliomyelitis, H1N1, Ebola, MERS-CoV, Difteri serta TB RO (Riskesmas, 2018).

Tanda dan gejala dari infeksi meliputi *White Blood Cell Count*, nyeri dan inflamasi. Sebagian besar infeksi mengakibatkan peningkatan jumlah sel darah putih (leukosit) karena mobilisasi granulosit dan atau limfosit untuk menghancurkan mikroba yang masuk ke dalam tubuh. Sedangkan nyeri dan inflamasi terkadang menjadi gejala yang menyertai infeksi dengan dimanifestasikan oleh pembengkakan, eritema, sensitif terhadap nyeri tekan, maupun luka bernanah. Sayangnya, tanda-tanda ini hanya dapat terlihat jika infeksi tersebut dangkal atau terjadi pada tulang atau sendi (Dipiro *et al.*, 2015).



Tubuh yang terinfeksi harus diambil sampelnya, sebelum diberikan terapi antimikroba. Pewarnaan gram dapat mengidentifikasi jenis bakteri. Keterlambatan dalam memperoleh cairan atau jaringan yang terinfeksi hingga setelah terapi diberikan dapat mengakibatkan hasil kultur negatif palsu, atau perubahan komposisi seluler dan cairan tubuh yang terinfeksi. Kultur darah harus dilakukan pada pasien demam akut. Cairan atau jaringan yang kurang dapat diakses diperoleh saat diperlukan untuk menilai tanda atau gejala yang terlokalisasi (misalnya, cairan tulang belakang pada meningitis dan cairan sendi pada artritis) (Dipiro *et al.*, 2015).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1.1 Karakteristik Umum

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk *spheric* (bulat). Bakteri ini dalam bentuk koloni menyerupai anggur ketika diamati di mikroskop cahaya setelah pewarnaan Gram. Nama '*Staphylococcus*' berasal dari bahasa Yunani, yang berarti anggur (*staphyle*) dan beri (*kokkos*). Pengamatan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan hasil sel berbentuk seperti bola dengan permukaan yang halus, diameter sel 0.5-1.0 μm (Gnanamani *et al.*, 2017). Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C) (Jawetz *et al.*, 2010).

Staphylococcus aureus adalah organisme aerob dan anaerob fakultatif yang membentuk koloni berwarna kuning dan putih pada media nutrisi agar (NA). Warna kuning berasal dari produksi karotenoid yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini. *S. aureus* dapat memproduksi empat macam *haemolysins*, yaitu alfa, beta, gamma, dan delta yang dapat menyebabkan hemolitik ketika bakteri ini ditanam dalam *blood agar*.



Sebagian besar isolat *S. aureus* menghasilkan enzim koagulase. *S. aureus* juga toleran terhadap garam. Bakteri ini mampu tumbuh dalam medium *mannitol-salt agar* yang mengandung 7.5% NaCl. Organisme ini bersifat katalase positif dan oksidase negatif (Gnanamani *et al.*, 2017).

2.1.1.2 Manifestasi Klinis

Staphylococcus aureus menyebabkan berbagai infeksi pada manusia. Infeksi klinis *S. aureus* diklasifikasikan ke dalam kategori komunitas dan nosokomial berdasarkan asal infeksi. Kedua jenis ini berbeda dalam manifestasi klinis infeksi, kerentanan antibiotik dan latar belakang genetik dari strain *S. aureus* yang menginfeksi. Selama beberapa dekade, *S. aureus* telah menjadi patogen nosokomial dan merupakan penyebab utama mortalitas dan morbiditas di rumah sakit. Namun bukan hanya di rumah sakit, saat ini infeksi *S. aureus* di komunitas juga terus meningkat (Gnanamani *et al.*, 2017).

Infeksi *Staphylococcus* paling sering muncul pada kulit dan jaringan lunak. Infeksi ini menyebabkan lebih dari sepuluh juta kunjungan rawat jalan dan hampir setengah juta rawat inap per tahun di AS (Myles dan Datta, 2012). *Staphylococcus aureus* adalah patogen mayor pada manusia yang menyebabkan berbagai infeksi.

Bakteri ini adalah penyebab utama bakteremia dan endokarditis infeksi serta infeksi osteoartikular (osteomyelitis, septic arthritis, dan infeksi sendi prostetik), infeksi kulit dan jaringan lunak, infeksi pleuropulmonary, infeksi prostetik karena alat (*cardiac device*, *catheter*, *breast implant*, *penis implant*), dan sindrom staphylococcal klinis lain (abses epidural, meningitis, *toxic shock syndrome*, infeksi saluran kemih, dan septic thrombophlebitis) (Tong *et al.*, 2015).



2.1.1.3 Patogenesis

Proses infeksi *Staphylococcus aureus* terdiri dari lima tahap, yaitu kolonisasi, infeksi lokal, diseminasi sistemik dan/atau sepsis, infeksi *metastatic*, dan toxinosis. Organisme ini dapat bertahan selama berminggu-minggu hingga berbulan-bulan tanpa menyebabkan infeksi. Kolonisasi bakteri tersebut dapat berkembang menjadi infeksi pada saat-saat tertentu ketika terdapat faktor predisposisi, seperti rawat inap yang berkepanjangan, penekanan sistem imun, operasi, penggunaan alat medis invasif, dan adanya penyakit metabolik kronis. Abses kulit lokal dapat terbentuk ketika bakteri ini diinokulasi ke kulit dan dalam tahap lanjut dapat menyebar dan menghasilkan berbagai manifestasi klinis dari infeksi lokal seperti *carbuncle*, *cellulitis*, *impetigo bullosa*, atau *wound infection*. *S. aureus* dapat masuk ke dalam darah dan menyebar secara sistemik ke berbagai organ tubuh lain dan menyebabkan sepsis. Penyebaran yang telah mencapai sistemik ini dapat menyebabkan endokarditis, osteomielitis, radang pada sel ginjal, artritis septik, dan abses epidural. Selain itu, toxin yang dikeluarkan oleh *S. aureus* juga dapat menyebabkan sindrom syok toksik, sindrom kulit melepuh, dan *foot borne gastroenteritis* (Gnanamani *et al.*, 2017).

2.2 Antibiotik

Antibiotik adalah antimikroba yang digunakan untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Istilah antibiotik pada mulanya merujuk pada senyawa alami yang dihasilkan oleh jamur atau mikroorganisme lain yang dapat menghambat perkembangan hingga membunuh bakteri. Seiring kemajuan ilmu dan teknologi, mulai ditemukan antibiotik yang berasal dari hasil sintesis yang juga memiliki efek dalam



menghambat atau membunuh bakteri (Katzung, 2007). Antibiotik dalam terapi digunakan untuk mencegah dan mengobati infeksi bakteri (WHO, 2017).

Agan antibiotik diklasifikasikan berdasarkan struktur kimia dan mekanisme aksinya, yaitu: (1) agen yang menghambat sintesis dinding sel bakteri, termasuk kelas β -laktam (misalnya, penisilin, sefalosporin, dan karbapenem) dan agen berbeda seperti sikloserin, vankomisin, dan bacitracin; (2) agen yang bertindak langsung pada membran sel mikroorganisme, meningkatkan permeabilitas dan menyebabkan kebocoran senyawa intraseluler seperti polimiksin (3) agen yang mengganggu fungsi subunit ribosom 30S atau 50S untuk menghambat sintesis protein secara reversibel, yang umumnya bersifat bakteristatik (mis., Kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, klindamisin) ; (4) agen yang mengikat subunit ribosom 30S dan mengubah sintesis protein, yang umumnya bersifat bakterisida (mis., Aminoglikosida); (5) agen yang memengaruhi metabolisme asam nukleat bakteri, seperti rifamycin (mis., Rifampin dan rifabutin), yang menghambat RNA polimerase, dan kuinolon, yang menghambat topoisomerase; dan (6) antimetabolit, termasuk trimetoprim dan sulfonamida, yang menghambat enzim esensial dari metabolisme folat. Kategori tambahan kemungkinan akan muncul karena mekanisme yang lebih kompleks dijelaskan (Brunton, 2014).

2.2.1 Aminoglikosida

Aminoglikosida adalah antibiotik alami atau semisintetik yang berasal dari *actinomycetes*, yang bersifat bakterisidal. Aminoglikosida merupakan salah satu jenis antibiotik tertua yang digunakan untuk menangani berbagai infeksi serius yang disebabkan oleh bakteri gram negatif maupun beberapa bakteri jenis gram positif. Beberapa contoh obat-obatan yang masuk ke dalam golongan



aminoglikosida antara lain streptomisin, neomisin, kanamisin, amikasin, gentamisin, tobramisin, sisomisin, dan netilmisin (Krause *et al.*, 2016).

Aminoglikosida bekerja dengan menghambat sintesis protein, mengikat dengan afinitas yang tinggi, pada *A-side* RNA ribosom 16S dari ribosom 30S, dengan mengubah konformasi. Setiap golongan aminoglikosida menghambat daerah yang berbeda pada *A-side* RNA ribosom. Aminoglikosida menjadi pilihan karena memiliki efek bakterisidal yang cepat, stabil secara kimia, sinergis dengan antibiotika golongan beta-laktam, insiden resistensi yang rendah, dan biaya yang murah. Antibiotik golongan ini memiliki efek samping yaitu nefrotoksik dan ototoksik. Efek nefrotoksik dari aminoglikosida mencapai 10-25% dari total penggunaan terapi walaupun telah dilakukan pemantauan yang teliti. Efek nefrotoksik dari aminoglikosida merupakan efek samping yang paling penting dan merugikan dari antibiotik aminoglikosida. Efek ini merupakan salah satu penyebab mengapa pada akhir tahun 1970-an terjadi penurunan penggunaan aminoglikosida dan peningkatan penggunaan antibiotik-antibiotik baru berspektrum luas (Krause *et al.*, 2016).

Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang diisolasi dari *Microspora purpurea*. Obat ini efektif terhadap organisme gram-positif seperti spesies *Staphylococcus*, dan gram negatif spesies *Bacteria Citrobacter*, spesies *Enterobacter*, *Escherichia coli*, spesies *Klebsiella*, spesies *Proteus*, spesies *Serratia* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Gentamisin akan berikatan dengan ribosomal subunit 30s dan 50s pada bakteri dan menghambat sintesis proteinnya sehingga terjadi kerusakan membran sel bakteri (Katzung, 2010).



Pathogen	Susceptibility Interpretive Criteria					
	Minimal Inhibitory Concentration (mcg/mL)			Zone Diameter (mm)		
	(S)	(I)	(R)	(S)	(I)	(R)
<i>Enterobacteriaceae</i> ^a	≤4	8	≥16	≥15	13 to 14	≤12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤4	8	≥16	≥15	13 to 14	≤12
<i>Staphylococcus species</i> ^b	≤4	8	≥16	≥15	13 to 14	≤12

S = Susceptible, I = Intermediate, R = Resistant

Gambar 2.1 Kriteria Interpretasi Sensitivitas untuk Gentamisin (FDA, 2013)

"Susceptible" menunjukkan bahwa antimikroba kemungkinan akan menghambat pertumbuhan patogen. "Intermediate" menunjukkan bahwa hasilnya *equivocal* (samar-samar), dan jika mikroorganisme tidak sepenuhnya sensitive terhadap obat-obatan alternatif yang layak secara klinis, pengujian harus dilakukan ulang. "Resistant" menunjukkan bahwa antimikroba tidak mungkin menghambat pertumbuhan patogen jika senyawa antimikroba mencapai konsentrasi yang biasanya dapat dicapai di lokasi infeksi, terapi lain harus dipilih (FDA, 2013).

2.3 Resistensi Antibiotik

Resistensi antibiotik adalah kemampuan bakteri atau mikroorganisme lain untuk bertahan hidup dan bereproduksi dengan adanya dosis antibiotik yang sebelumnya dianggap efektif untuk membunuh bakteri tersebut. Penyebab utama resistensi antibiotik adalah penggunaannya yang meluas dan irasional. Resistensi antibiotik merupakan keadaan darurat pada kesehatan masyarakat karena bakteri yang resisten lebih sulit untuk diobati dan membutuhkan biaya yang lebih mahal.

Masalah utama saat ini adalah munculnya *multi-drug resistance* (MDR) yang



merupakan resistensi terhadap beberapa jenis agen antimikroba (Dugassa dan Shukuri, 2017).

Timbulnya resistensi terhadap suatu antibiotika terjadi berdasarkan salah satu atau lebih mekanisme berikut (Dugassa dan Shukuri, 2017):

- 1) Bakteri mensintesis suatu enzim inaktivator atau penghancur antibiotika. Contohnya yaitu betalaktamase yang mampu menghancurkan cincin beta-laktam dari antibiotic beta lactam seperti penisilin sehingga menyebabkan antibiotic tidak dapat menempel pada reseptor. Mekanisme resistensi ini dapat ditransfer dari satu bakteri ke bakteri.
- 2) Bakteri mengubah permeabilitasnya terhadap obat. Mekanisme ini dapat disebabkan adanya mutase gen yang menyebabkan perubahan muatan listrik atau struktur fisik sehingga antibiotik sulit untuk masuk ke dalam sel. Pada mekanisme ini, antibiotic masih berfungsi aktif tetapi gagal untuk mencapai target sehingga tidak dapat berefek.
- 3) Bakteri mengembangkan suatu perubahan struktur target obat. Bakteri dapat menurunkan efektivitas obat jika molekul target sedikit berubah dalam strukturnya sehingga antibiotik mungkin tidak lagi dapat mengikat molekul target. Misalnya, tetrasiklin memblokir situs akses RNA transfer dengan mengikatnya. Sedikit perubahan pada target dapat mengakibatkan resistensi mikroba terhadap tetrasiklin
- 4) Efflux antibiotic. Mekanisme ini menyebabkan resistensi terhadap antibiotik melalui pompa efflux. Pompa efflux adalah pompa biologis yang dapat memaksa antibiotik keluar sel sehingga tidak dapat



mencapai target kerjanya. Mekanisme ini sering menyebabkan resistensi terhadap lebih dari satu golongan antibiotik terutama makrolida, tetrasiklin dan floroquinolon karena antibiotic tersebut menghambat berbagai aspek protein dan biosintesa DNA sehingga harus berada di intraseluler agar berefek.

2.4 Sintesis

Sintesis organik adalah proses membangun molekul organik dari prekursor yang lebih sederhana. Untuk memperoleh senyawa baru yang akan berpotensi sebagai calon obat baru diperlukan suatu proses modifikasi struktur senyawa melalui reaksi sintesis secara kimia, untuk memperoleh senyawa baru yang relatif murni, memiliki aktivitas farmakologis yang lebih tinggi dibandingkan senyawa induknya, maupun mendapatkan molekul dengan karakter yang dapat meningkatkan efek senyawa tertentu atau mengurangi efek samping yang tidak diinginkan. Sintesis senyawa organik dilakukan karena berbagai alasan, dapat digunakan untuk menguji hipotesis tentang mekanisme reaksi atau tentang bagaimana proses organisme tertentu memetabolisme suatu senyawa (Solomons *et al.*, 2014).

Sintesis organik yang sangat sederhana dapat hanya melibatkan satu reaksi kimia, sedang yang lain dapat memerlukan beberapa hingga 20 tahapan atau lebih. Metode reaksi sintesis satu tahap memiliki keunggulan bila dibandingkan dengan metode reaksi sintesis yang melalui beberapa tahapan reaksi, karena senyawa target akan langsung bisa diperoleh (Solomons *et al.*, 2014). Sintesis organik biasanya melibatkan dua jenis transformasi, reaksi yang mengubah gugus fungsi dari satu yang

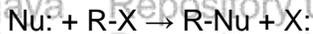


lain dan reaksi yang menghasilkan ikatan karbon-karbon baru. Sintesis kimia dapat dibagi menjadi beberapa sub reaksi antara lain reaksi substitusi, eliminasi, adisi (Klein, 2012). Pada penelitian ini digunakan metode *Schotten-Bauman*.

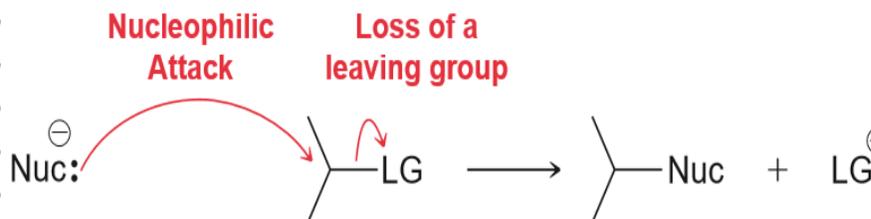
2.4.1 Substitusi Nukleofilik

Reaksi substitusi nukleofilik adalah salah satu jenis reaksi organik yang paling mendasar. Dalam reaksi substitusi nukleofilik, sebuah nukleofil yang "kaya" elektron, secara selektif berikatan dengan atau menyerang muatan positif dari sebuah gugus kimia atau atom yang disebut gugus lepas (*leaving group*) (Klein, 2012).

Bentuk umum reaksi ini adalah sebagai berikut (Klein, 2012):



Nu menandakan nukleofil, (:) menandakan pasangan elektron, serta R-X menandakan substrat dengan *leaving group* X. Pada reaksi tersebut, pasangan elektron dari nukleofil menyerang substrat membentuk ikatan baru, sementara *leaving group* melepaskan diri bersama dengan sepasang elektron. Produk utamanya adalah R-Nu. Nukleofil dapat memiliki muatan listrik negatif ataupun netral, sedangkan substrat biasanya netral atau bermuatan positif. Reaksi substitusi nukleofilik dapat dibedakan menjadi dua yaitu reaksi substitusi unimolekuler (SN-1) atau disebut reaksi orde satu, dan reaksi substitusi nukleofilik bimolekuler (SN-2) atau yang disebut sebagai orde dua. Laju reaksi pada SN-1 dipengaruhi oleh substrat sedangkan laju reaksi pada SN-2 dipengaruhi oleh substrat dan nukleofil (Klein, 2012).

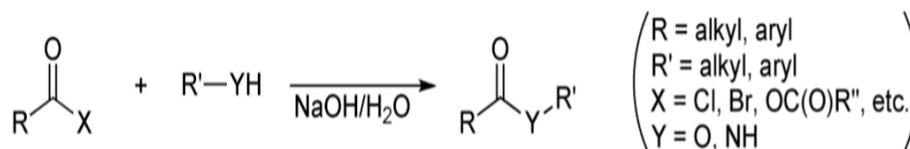


Gambar 2.2 Reaksi Substitusi Nukleofilik (Klein, 2012)

2.4.2 Schotten-Baumann

Untuk mensintesis turunan urea yang merupakan senyawa karbamida diperlukan metode terpilih yaitu metode *Schotten-Baumann*, yang merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida. Reaksi *Schotten-Baumann* adalah reaksi organik yang digunakan untuk mengubah asil halida atau anhidrida menjadi amida jika bereaksi dengan amina dan basa, atau ester jika bereaksi dengan alkohol dan basa.

Reaksi dengan amina dimulai dengan nitrogen menyerang karbon karbonil dari asil halida yang disusun kembali, untuk melepaskan halida. Deprotonasi dengan basa kemudian menghasilkan produk akhir amida. Reaksi dengan alkohol akan terjadi dengan cara yang sama (Wang, 2010).



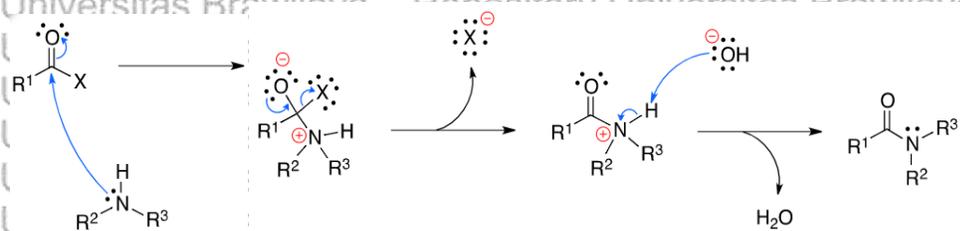
Gambar 2.3 Reaksi *Schotten-Baumann* (Wang, 2010)

Metode sintesis *Schotten-Baumann* menggunakan penambahan basa yang digunakan untuk menghasilkan ekuilibrium dalam pembentukan amida dari amina dan asam klorida, yang sudah dimodifikasi melalui reaksi substitusi nukleofilik (benzoylasi).

Asilasi amina dengan *carboxylic acid chlorides* mengarah pada produksi samping



asam, yang akan membentuk garam dengan amina yang tidak bereaksi dan mengurangi hasil produk. Selama asilasi amina, keberadaan basa sangat penting, karena substrat amina menjadi tidak reaktif saat protonasi oleh produk samping asam (basa yang digunakan harus lebih kuat dari substrat amina). Dalam reaksinya nukleofil akan mengadisi ke dalam cincin aromatik menghasilkan anion yang terdelokasi sehingga anion tersebut melepaskan ion hidrida (Bamane *et al.*, 2011).

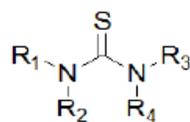


Gambar 2.4 Reaksi Schotten-Baumann (Name Reaction, 2020)

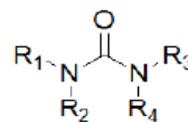
Pada penelitian ini bahan yang digunakan merupakan turunan dari benzoil klorida yaitu 4-klorobenzoil klorida, hingga menjadi 1-*alil*-3-(4-klorobenzoil) tiourea. Penambahan gugus halogen yang merupakan gugus penarik elektron, akan meningkatkan sifat elektronik senyawa dan merubah parameter elektronik senyawa sehingga meningkatkan durasi aktivitas dengan mekanisme memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor. Selain itu gugus halogen juga memiliki tiga efek utama yaitu efek sterik, elektronik, dan obstruktif, sehingga diharapkan dapat menyebabkan perubahan aktivitas biologis. Penambahan ikatan tidak jenuh berupa alil dimungkinkan dapat meningkatkan aktivitas biologis senyawa melalui interaksi yang lebih baik antara senyawa dengan gugus-gugus pada konstituen sel reseptor (Budiati, 2010).



2.5 Tiourea



Thioureas



Ureas

Gambar 2.5 Tiourea dan Urea (Shakeel et al., 2016)

Tiourea adalah senyawa organik yang mengandung sulfur dengan rumus umum $(\text{R}_1\text{R}_2\text{N})(\text{R}_3\text{R}_4\text{N})\text{C}=\text{S}$. Struktur tiourea mirip dengan urea dimana oksigen pada urea digantikan dengan sulfur pada tiourea (Shakeel et al., 2016). Tiourea berbentuk padatan kristal putih, baik yang terbentuk secara alami maupun sintetis, larut dalam air, larutan amonium tiosianat dan etanol. Saat ini, tiourea digunakan dalam pencairan lem dan penghilang noda perak.. Pemaparan jangka panjang manusia terhadap tiourea dapat menyebabkan kerusakan sumsum tulang, yang mengakibatkan berkurangnya tingkat sel darah merah, sel darah putih dan / atau trombosit (Pubchem, 2019). Namun, senyawa turunan tiourea dan urea juga mempunyai aktivitas biologis yang luas; sebagai antivirus, anti-HIV, antibakteri, maupun aktivitasnya sebagai analgesik dan anti-inflamasi (Kamalulazmy, 2016)

2.5.1 Tiourea sebagai Antibakteri

Gugus tiourea banyak ditemukan secara alami dan memiliki aktivitas biologis yang beragam, salah satunya adalah antibakteri. Penelitian terkait aktivitas antibakteri senyawa turunan tiourea telah banyak dilakukan. Pada tahun 2015, Bialenica et al. melakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap 31 turunan senyawa tiourea yang mengandung gugus 3-(triflorometil)fenil. Pengujian dilakukan secara in vitro terhadap



berbagai bakteri Gram positif dan negatif. Hasilnya menunjukkan 7 senyawa turunan tiourea memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri Gram positif (cocci).

Turunan ariltiourea memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan alkiltiourea. Semakin tinggi nilai ClogP (sifat lipofilik) pada senyawa turunan ariltiourea berkorelasi dengan aktivitas antibakteri yang lebih baik. Tetapi adanya gugus fungsi alifatik atau alisiklik yang meruah pada cincin fenil akan menyebabkan nilai ClogP yang sangat tinggi sehingga menyebabkan absorpsi dan permeasi yang buruk dan menyebabkan hilangnya aktivitas antibiotik. Perbedaan jenis dan posisi gugus pada cincin benzena memberikan pengaruh yang bervariasi pada aktivitas antibakteri.

Secara umum dapat disimpulkan bahwa senyawa dengan gugus halogen pada posisi meta- atau para- pada cincin benzena memiliki aktivitas antibakteri yang paling baik.

Menurut Halim dan Zainab (2016), turunan tiourea memiliki potensi sebagai prekursor yang cocok untuk berbagai sintesis senyawa baru, dikarenakan memiliki dua gugus amina primer yang reaktif. Pada penelitian ini, digunakan bis(tiourea) yang diperkirakan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibanding turunan monotiourea, dikarenakan keberadaan dua gugus tiourea. Turunan Bis(tiourea) (2a-c) disubstitusi dengan rantai alkil C10, C12, dan C14. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh nilai Kadar Hambar Minimum (KHM) turunan Bis(tiourea) 2a dan 2b dengan substitusi C10 dan C12 masing-masing $135\mu\text{g/mL}$ dan $145\mu\text{g/mL}$, yang menunjukkan hasil yang sangat baik, jika dibandingkan dengan antibiotik ampisilin sebesar $108\mu\text{g/mL}$. Penambahan rantai alkil dikatakan dapat meningkatkan lipofilisitas dan aktivitas biologis senyawa turunan tiourea. Sifat lipofilik ini



meningkatkan kemampuan penetrasi pada mikroorganisme melalui lapisan lipid membran sel.

Menurut Arslan *et al.* (2009) turunan tiourea memiliki peran yang besar sebagai pereaksi organik, salah satunya sebagai ligan donor potensial untuk ion logam transisi. Atom donor oksigen, nitrogen, dan sulfur dari turunan tiourea memiliki banyak potensi ikatan. Ligan dan kompleks logamnya menampilkan berbagai aktivitas biologis, salah satunya aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini senyawa turunan tiourea disubstitusi dengan logam Ni^{2+} (Tembaga) dan Cu^{2+} (Nikel). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kompleks tembaga lebih aktif terhadap jamur yeast dibandingkan dengan kompleks nikel. Peningkatan aktivitas antijamur tersebut dimungkinkan disebabkan reaksi kompleksasi yang mengurangi polaritas ion logam.

Sifat lipofilik dari atom logam meningkatkan kemampuan penetrasi pada mikroorganisme melalui lapisan lipid membran sel.

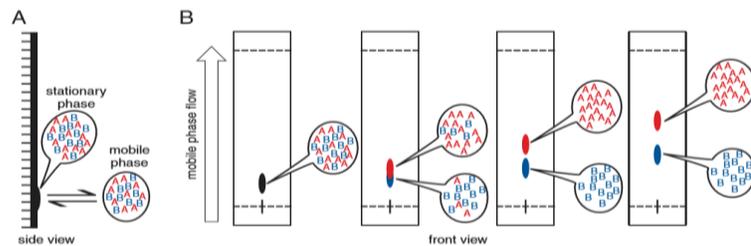
2.6 Uji Kemurnian

2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) atau adalah salah satu metode pemisahan komponen dalam sampel berdasarkan perbedaan distribusi diantara fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam berupa plat dengan lapisan bahan adsorben dan fasa gerak umumnya bersifat cair (larutan). Fase diam menggunakan kromatografi lapis tipis dengan plat kaca tipis yang dilapisi dengan aluminium oksida atau silika gel sebagai padatan. Fase gerak atau seluler adalah pelarut yang dipilih menurut sifat-sifat komponen dalam campuran. Prinsip KLT adalah suatu teknik pemisahan zat terlarut



oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat tersebut memiliki perbedaan mobilitas yang disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion (Chai, 2014).



Gambar 2.6 (A) Campuran A dan B diadsorpsi pada fase diam (B) Representasi skematis prinsip pemisahan KLT (Chai, 2014)

Kromatografi merupakan teknik pemisahan berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibandingkan dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal didefinisikan sebagai nilai R_f (*refraction factor*). Secara matematis dapat dinyatakan sebagai berikut (Kumar *et al.*, 2013):

$$R_f = \frac{\text{Jarak ditempuh komponen}}{\text{Jarak ditempuh pelarut}}$$

2.6.2 Uji Rentang Titik Leleh

Melting point atau titik lebur/titik leleh adalah analisis yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampel yang relatif murni secara kualitatif maupun kuantitatif (sekitar <10% pengotor). Analisis titik lebur, mencirikan sifat fisik yang stabil, dari sampel secara langsung, yang kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampel. Titik lebur adalah temperatur senyawa padat dimana benda tersebut akan



berubah wujud menjadi zat cair. Pada senyawa dengan berat molekul hampir sama, senyawa lebih polar dan senyawa yang struktur molekulnya lebih simetris mempunyai titik lebur yang lebih tinggi (Raja dan Andrew, 2020).

Titik lebur senyawa murni ditentukan dengan pengamatan temperetur saat terjadi perubahan padatan dan cairan. Sejumlah kecil zat padat diletakkan dalam tabung kapiler gelas dan dipanaskan merata. Diamati temperatur saat mulai terbentuk cairan kemudian temperatur saat padatan berubah menjadi cairan semua. Rentang temperatur yang tidak begitu jauh menunjukkan kemurnian padatan tersebut. Titik leleh yang ada pada literatur umumnya dalam *range* titik leleh. Sampel murni biasanya memiliki kisaran titik leleh 1 - 2° C, namun hal ini dapat diperluas karena sifat koligatifnya. Analisis titik lebur cukup spesifik dan akurat mengingat kesederhanaannya. Karena titik lebur adalah karakteristik fisik unik suatu zat, analisis titik lebur memang memiliki spesifisitas tinggi. Namun, titik lebur senyawa juga tergantung pada tekanan, sehingga hasil eksperimen dapat bervariasi dari nilai literatur, terutama di lokasi ekstrem, yaitu, tempat-tempat dengan ketinggian tinggi. Selain itu, sumber kesalahan terbesar berasal dari deteksi visual pencairan oleh eksperimen. Dengan mengontrol laju perubahan dan melakukan beberapa uji coba dapat mengurangi tingkat kesalahan (Raja dan Andrew, 2020).

2.7 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

2.7.1 Spektrofotometri Inframerah (IR)

Spektrum inframerah dapat digunakan dalam konfirmasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang gugus yang terdapat pada suatu molekul. Konfirmasi



struktur dilakukan dengan melihat intensitas dan bilangan gelombang (ν) pita serapan dari spektrum yang terbentuk. Prinsip spektroskopi IR adalah pengukuran jumlah radiasi IR, yang di absorpsi dari suatu sampel (atau diemisikan) sebagai fungsi dari panjang gelombang. Pengukuran IR dilakukan dalam prinsip transmisi atau refleksi.

Prinsip kerja spektroskopi FTIR adalah adanya interaksi energi dengan materi. Misalkan dalam suatu percobaan berupa molekul senyawa kompleks yang ditembak dengan energi dari sumber sinar yang akan menyebabkan molekul tersebut mengalami vibrasi. Vibrasi dapat terjadi karena energi yang berasal dari sinar infrared tidak cukup kuat untuk menyebabkan terjadinya atomisasi ataupun eksitasi elektron pada molekul senyawa yang ditembak dimana besarnya energi vibrasi tiap atom atau molekul berbeda tergantung pada atom-atom dan kekuatan ikatan yang menghubungkannya, sehingga dihasilkan frekuensi yang berbeda. Spektroskopi IR memiliki potensi yang baik untuk mengidentifikasi struktur molekul. Ketika spektrum referensi tersedia, sebagian besar senyawa dapat secara jelas diidentifikasi berdasarkan spektrum IR-nya. Spektrum IR berisikan informasi struktural molekul (Bunachiu *et al.*, 2011).

Spektroskopi inframerah berfokus pada radiasi elektromagnetik pada rentang frekuensi $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ di mana cm^{-1} disebut sebagai wavenumber ($1/\text{wavelength}$), yakni suatu ukuran unit untuk frekuensi. Spektrum IR dari molekul *poly-atomic* didasarkan pada getaran atau vibrasi molekul, masing-masing bergantung pada massa atom, kekuatan ikatan, dan interaksi intra dan inter molekul (Bunaciu *et al.*, 2011). Spektrum inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi molekul, seperti sidik jari yang dimiliki manusia. Dengan membandingkan spektrum inframerah dari



dua zat, dapat ditentukan apakah dua senyawa tersebut identik atau berbeda. Jika spektrum inframerah tersebut berhimpitan satu sama lain, dalam banyak kasus, kedua senyawa tersebut dinyatakan identik. Spektrum inframerah juga dapat digunakan sebagai informasi tentang struktur molekul. Serapan dari masing-masing jenis ikatan (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C-C, C=C, C≡C, C≡N, dan sebagainya) hanya ditemukan dalam sebagian kecil dari daerah getaran inframerah. Berbagai rentang penyerapan bersifat spesifik untuk setiap jenis ikatan (Pavia *et al.*, 2009).

2.7.2 Spektrometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{12}\text{C-NMR}$

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) adalah teknik spektroskopi yang mendeteksi energi yang diserap terhadap perubahan *nuclear spin state*. Spektrometri NMR ini memberikan banyak informasi mengenai kedudukan gugus fungsi. NMR dapat memberikan informasi, pada tingkat atom, tentang dinamika protein dan asam nukleat pada rentang skala waktu yang sangat luas, mulai dari detik hingga pico-detik. Prinsip NMR didasarkan pada fakta bahwa inti atom memiliki sifat magnetik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu informasi kimia. Jika sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Karena adanya interaksi ini, magnet kecil akan terbagi atas dua tingkat energi (tingkat yang sedikit agak lebih stabil (+) dan keadaan yang kurang stabil (-)) yang energinya berbeda. Karena inti merupakan materi mikroskopik, maka energi yang berkaitan dengan inti ini terkuantisasi, artinya tidak kontinu (Pavia *et al.*, 2009).

Nuclear magnetic resonance terjadi ketika sampel ditempatkan dalam medan magnet dan mengalami radiasi *radiofrequency* pada frekuensi tertentu, kemudian inti



27

dalam sampel akan menyerap energi. Frekuensi radiasi pada penyerapan energi tergantung pada tiga hal, karakteristik dari jenis inti atom (contoh : ^1H atau ^{13}C), frekuensi yang tergantung pada lingkungan inti atom (contoh: proton dari metil dan hidroksil pada metanol menyerap pada frekuensi yang berbeda), frekuensi NMR juga tergantung pada lokasi spasial dalam medan magnet jika medan tidak tersebar seragam. Secara prinsip, frekuensi gelombang elektromagnetik yang diserap ditentukan oleh kekuatan magnet dan jenis inti yang diamati. Namun, perubahan kecil dalam frekuensi diinduksi oleh perbedaan lingkungan kimia tempat inti tersebut berada. Perubahan ini disebut pergeseran kimia. Dalam spektrometri ^1H NMR, pergeseran kimia diungkapkan sebagai nilai relatif terhadap frekuensi absorpsi (0 Hz) tetrametilsilan standar (TMS) $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Frekuensi resonansi (frekuensi absorpsi) proton (atau inti lain) sebanding dengan kekuatan magnet spektrometer. Perbandingan data spektrum akan sukar bila spektrum yang didapat dengan magnet berbeda kekuatannya (Pavia *et.al*, 2009).

Spektroskopi ^1H -Resonansi Magnet Inti (^1H -NMR) merupakan metode yang penting dalam identifikasi struktur, karena dapat memberikan informasi tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen dalam molekul. Informasi yang sama juga dapat didapatkan untuk inti karbon. Pada puncak spektra RMI- ^1H terdapat integrasi, sehingga dapat dilihat intensitas dan jumlah atom hidrogen. Jenis puncak yang terdapat dalam spektra RMI- ^1H yaitu *singlet*, *duplet*, *triplet*, *quartet*, *quintet*, dan *multiplet*. (Pavia *et.al*, 2009).

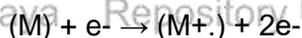


2.7.3 Spektrometri Massa

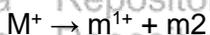
Spektrometri massa merupakan teknik analisa yang berdasarkan pada pemisahan ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion tersebut. Spektrometri massa merupakan metode yang penting dalam konfirmasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang fragmentasi gugus fungsi dan massa ion senyawa (Siswandono, 1999). Ada beberapa metode ionisasi yang digunakan dalam metode spektrometri massa, yaitu *electron ionization, chemical ionization, desorption ionization, electrospray ionization*.

Setelah sampel telah terionisasi, sinar dari ion dipercepat oleh medan listrik dan kemudian diteruskan melewati *mass analyzer*, komponen dari spektrometer massa dimana ion dipisahkan berdasarkan rasio massa-muatan (m/z) (Pavia, *et al.* 2009).

Prinsip kerja dari spektrometri massa adalah molekul sampel dalam fase uap dibombardir dengan elektron berenergi tinggi (70 eV) yang menyebabkan lepasnya satu elektron dari kulit valensi molekul tersebut. Molekul yang kehilangan satu elektron akan menjadi suatu kation radikal (Pavia *et al.*, 2009).



Kation radikal tersebut mengandung semua atom-atom dari molekul asal, minus satu elektron, dan disebut ion molekul /molecular ion, dan dinyatakan dengan M^+ . Sebagai hasil dari tabrakan dengan elektron berenergi tinggi, ion molekul akan mempunyai energi yang tinggi dan dapat pecah menjadi fragmen yang lebih kecil (kation, radikal atau molekul netral) (Pavia *et al.*, 2009).





Ion molekuler, ion fragmen dan ion radikal fragmen dipisahkan menggunakan medan magnet sesuai dengan perbandingan massa /muatannya (m/z), dan menghasilkan arus listrik (arus ion) pada kolektor/detektor yang sebanding dengan kelimpahan relatifnya. Fragmen dengan m/z yang besar akan turun terlebih dahulu diikuti fragmen dengan m/z yang lebih kecil (Silverstein *et al.*, 1991).

Spektrometri massa pada umumnya digunakan untuk menentukan massa molekuler, menentukan rumus molekuler dengan menggunakan spektrum Massa Beresolusi Tinggi (*High Resolution Mass Spectra*), dan untuk mengetahui informasi dari struktur dengan melihat pola fragmentasinya (Silverstein *et al.*, 1986).

Spektrometer massa bekerja melalui 4 tahap yaitu:

1. Ionisasi : Ada beberapa metode ionisasi untuk analisis spektrometer massa.

Electron Impact ionization (EI) adalah metode ionisasi yang umum digunakan.

Sampel diuapkan pada kondisi hampa udara pada tekanan 10⁻⁴ sampai 10⁻⁶ mmHg pada suhu tertentu. Sampel yang berupa uap akan diteruskan ke dalam ruang pengion. Di dalam ruang pengion ini, sampel dibombardir dengan arus electron sekitar 70 eV sehingga terbentuk ion molekuler. Kemudian ion molekuler tersebut terpecah lagi menjadi ion-ion yang lebih kecil (Agusta, 2000).

2. Akselerasi : Ion yang terbentuk akan diakselerasi sehingga seluruhnya akan mempunyai energi kinetik yang sama. Ion positif akan ditolak dari ruang ionisasi dan seluruh ion diakselerasikan menjadi sinar ion yang terfokus dan tajam.

3. Defleksi : Ion didefleksikan (dibelokkan) oleh medan magnet sesuai dengan massanya. Besarnya defleksi tergantung pada : massa ion yaitu ion yang



memiliki massa kecil akan lebih terdefleksi dari yang berat dan muatan ion yaitu ion yang mempunyai 2 atau lebih muatan positif akan lebih terdefleksi dari yang hanya mempunyai satu muatan positif. Kedua faktor ini digabung menjadi rasio massa/muatan (rasio massa/muatan). Rasio massa/muatan diberi simbol m/z

4. Deteksi : Ion yang melewati mesin akan dideteksi secara elektrik. Dari kromatogram dapat diperoleh informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang dianalisis yang ditunjukkan oleh jumlah puncak yang terbentuk pada kromatogram dengan kuantitasnya masing-masing. Spektrum massa hasil analisis sistem spektroskopi massa merupakan gambaran mengenai jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu komponen kimia. Setiap fragmen yang terbentuk dari pemecahan suatu komponen kimia memiliki berat molekul yang berbeda m/z (m/e , massa/muatan). Selanjutnya, spektrum massa komponen kimia yang diperoleh dari hasil analisis diidentifikasi dengan cara dibandingkan dengan spektrum massa yang terdapat dalam suatu bank data (Agusta, 2000).

2.7.4 Spektrofotometri Ultraviolet (UV)

Spektroskopi ultraviolet (UV) adalah teknik fisik spektroskopi optik yang menggunakan cahaya dalam rentang sinar tampak, ultraviolet, dan inframerah dekat.

Hukum Beer-Lambert menyatakan bahwa absorbansi larutan berbanding lurus dengan konsentrasi spesies penyerap dalam larutan dan panjang jalur. Dengan demikian, untuk panjang jalur yang tetap, spektroskopi UV / VIS dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi penyerap dalam suatu larutan. Spektroskopi UV / VIS



dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi suatu zat dalam larutan. Keunggulan UV-Visible, antara lain sederhana, cepat, akurat, dan efektif dalam biaya (Shah *et al.*, 2015).

Metode analisis didasarkan pada pengukuran penyerapan cahaya monokromatik oleh senyawa tidak berwarna di jalur spektrum ultraviolet dekat (200-380nm). Metode fotometrik analisis didasarkan pada hukum Bouguer-Lambert-Beer, yang menetapkan bahwa absorbansi suatu larutan berbanding lurus dengan konsentrasi analit. Prinsip dasar pengoperasian spektrofotometer yang meliputi wilayah UV terdiri dari cahaya interval panjang gelombang tertentu yang melewati sel dengan pelarut dan jatuh ke sel fotoelektrik yang mengubah energi radiasi menjadi energi listrik yang diukur dengan galvanometer. Spektroskopi ultraviolet digunakan untuk memperoleh spektrum absorbansi suatu senyawa dalam larutan atau sebagai padatan. Sebuah molekul atau ion akan menunjukkan penyerapan di wilayah visibel atau ultraviolet ketika radiasi menyebabkan transisi elektronik dalam strukturnya. Dengan demikian, penyerapan cahaya oleh sampel di daerah ultraviolet atau visibel disertai dengan perubahan keadaan elektronik dari molekul dalam sampel. Energi yang disuplai oleh cahaya akan mendorong elektron dari orbital keadaan dasarnya menjadi energi yang lebih tinggi, yaitu orbital keadaan tereksitasi. Apa yang sebenarnya diamati secara spektroskopi adalah penyerapan energi cahaya atau radiasi elektromagnetik elektron dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi singlet pertama dari suatu senyawa atau bahan. Wilayah energi UV-terlihat untuk spektrum elektromagnetik mencakup 1,5 - 6,2 eV dengan kisaran panjang gelombang 800 - 200 nm (Gandhimathi *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2015).



Data spektroskopi UV-Visible dapat memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif dari suatu senyawa atau molekul tertentu. Untuk informasi kuantitatif pada senyawa, perlu dilakukan kalibrasi instrumen menggunakan konsentrasi senyawa yang diketahui dalam larutan dengan pelarut yang sama dengan sampel yang tidak diketahui. Jika informasi yang diperlukan hanyalah bukti bahwa suatu senyawa dalam sampel sedang dianalisis, kurva kalibrasi tidak diperlukan. Namun, jika studi degradasi atau reaksi sedang dilakukan, dan konsentrasi senyawa dalam larutan diperlukan, maka kurva kalibrasi diperlukan. Untuk membuat kurva kalibrasi, setidaknya dibutuhkan tiga konsentrasi senyawa, tetapi jumlah konsentrasi paling ideal untuk kurva yang lebih akurat adalah lima konsentrasi (Gandhimathi *et al.*, 2012).

2.8 Uji Antibakteri

2.8.1 Metode Difusi

2.8.1.1 Difusi Agar-Cakram

Uji difusi agar-cakram dikembangkan pada tahun 1940. Metode ini banyak digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis untuk pengujian kerentanan antimikroba. Metode difusi agar-cakram merupakan metode standar yang digunakan untuk menguji patogen bakteri tertentu seperti *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* dan *Neisseria meningitidis* dengan menggunakan media kultur spesifik, berbagai kondisi inkubasi dan kriteria interpretatif untuk zona hambatan. Metode ini umum digunakan untuk skrining antimikroba dari ekstrak tumbuhan, minyak atsiri dan obat-obatan lain (CLSI, 2012).



Dalam prosedur difusi agar-cakram, plat agar diinokulasi dengan inokulum standar dari mikroorganisme uji. Kemudian, *filter paper disc* (berdiameter sekitar 6 mm), yang mengandung senyawa uji pada konsentrasi yang diinginkan, ditempatkan pada permukaan agar. Cawan petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Secara umum, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diukur diameter zona pertumbuhan penghambatan.

Antibiogram adalah alat yang dapat mengkategorikan berdasarkan fenotip resistansi dari strain mikroba yang diuji. Antibiogram memberikan hasil kualitatif dengan mengkategorikan bakteri yang rentan, sedang atau resisten. Namun, karena penghambatan pertumbuhan bakteri tidak berarti kematian bakteri, metode ini tidak dapat membedakan efek bakterisida dan bakteristatik (Balouiri *et al.*, 2016).

Metode difusi agar-cakram tidak dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi penghambatan minimum (MIC), karena tidak mungkin untuk menghitung jumlah agen antimikroba yang disebarkan ke dalam media agar. Namun, perkiraan MIC dapat dihitung untuk beberapa mikroorganisme dan antibiotik dengan membandingkan zona inhibisi dengan algoritma yang tersimpan. Uji difusi cakram memiliki banyak keunggulan dibandingkan metode lain, antara lain sederhana, biaya rendah, kemampuan untuk menguji sejumlah besar mikroorganisme dan agen antimikroba, dan kemudahan untuk menafsirkan hasil (Balouiri *et al.*, 2016).

2.8.1.2 Gradien Antimikroba (*E-test*)

Metode gradien antimikroba menggabungkan prinsip metode pengenceran dengan metode difusi untuk menentukan nilai MIC. Metode ini didasarkan pada gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar. *E-tests*



(*BioMérieux*) adalah versi komersial dari metode *E-test*. Dalam prosedur *E-test*, strip yang diresapi dengan peningkatan gradien konsentrasi agen antimikroba dari satu ujung ke ujung lainnya diendapkan pada permukaan agar, yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Metode ini digunakan untuk penentuan MIC antibiotik, antijamur dan antimikroba. Nilai MIC ditentukan pada persimpangan strip dan elips hambatan pertumbuhan. Metode ini sangat sederhana dan mudah diterapkan. Namun, harga strip *E-tests* cukup mahal (Balouiri et al., 2016).

Beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan korelasi yang baik antara nilai MIC yang diperoleh dari hasil *E-test* dan yang diperoleh dengan metode dilusi agar. Metode *E-test* ini juga dapat dilakukan untuk menyelidiki interaksi antimikroba antara dua obat (Berghaus et al., 2015). Untuk mempelajari efek gabungan dari dua antibiotik, strip *E-test* diresapi dengan antibiotik pertama, kemudian ditempatkan pada permukaan pelat agar pra-inokulasi. Setelah satu jam, strip dikeluarkan dan diganti dengan strip *E-test* kedua yang telah mengandung antibiotik kedua. Kemudian, setelah inkubasi, indeks konsentrasi penghambatan fraksional (FICI) dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\sum FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

Dimana:

$$FIC(A) = \frac{MIC(A) \text{ kombinasi}}{MIC(A) \text{ tunggal}}$$

$$FIC(B) = \frac{MIC(B) \text{ kombinasi}}{MIC(B) \text{ tunggal}}$$



Efek sinergi didefinisikan oleh $FICI \leq 0.5$ dan antagonisme oleh $FICI > 4$. FICI antara 0,5 dan 1 diartikan sebagai *addition* dan antara 1 dan 4 sebagai *indifference* (Bassole dan Juliani, 2012).

2.8.1.3 Difusi Agar-Sumuran

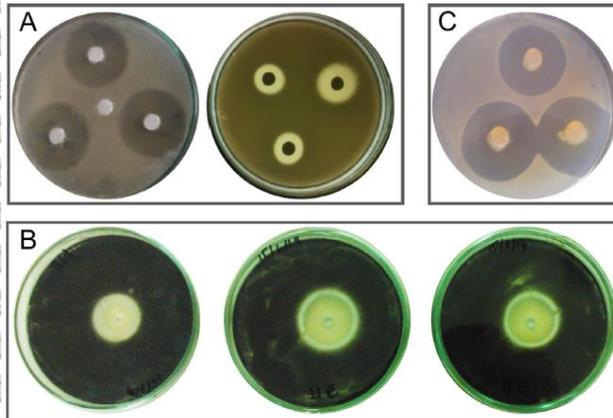
Metode difusi agar-sumuran baik secara luas digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba tanaman atau ekstrak mikroba. Mekanisme dari metode ini sama seperti prosedur yang digunakan dalam metode difusi cakram, yaitu permukaan pelat agar diinokulasi dengan menyebarkan volume inokulum mikroba di atas seluruh permukaan agar. Kemudian, dibuat lubang dengan diameter 6 sampai 8 mm secara aseptik dengan *cork borer* steril atau tip steril. Kemudian volume sebanyak 20-100 μL antimikroba atau larutan ekstrak pada konsentrasi yang diinginkan dimasukkan ke dalam sumur. Agar diinkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Agen antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain mikroba yang diuji (Magaldi *et al.*, 2004; Valgas *et al.*, 2007).

2.8.1.4 Difusi Agar-Plug

Metode difusi agar-plug sering digunakan untuk melihat antagonisme antara mikroorganisme. Prosedur metode ini mirip dengan yang digunakan dalam metode difusi cakram. Selama pertumbuhannya, sel mikroba mengeluarkan molekul yang berdifusi dalam medium agar. Setelah inkubasi, plot-agar atau silinder dipotong secara septik dengan *cork borer* steril dan diendapkan pada permukaan agar dari plat lain yang sebelumnya di okulasi oleh mikroorganisme uji. Zat-zat tersebut berdifusi dari plug ke media agar. Kemudian, aktivitas antimikroba dari molekul yang



disekresikan mikroba dideteksi oleh munculnya zona hambatan di sekitar plug agar (Balouiri *et al.*, 2016).



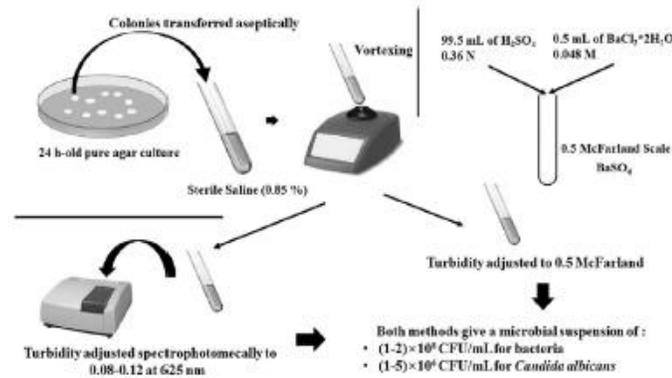
Gambar 2.8 Metode Difusi Agar (Balouiri *et al.*, 2016)

Keterangan: (A) Metode Difusi-Cakram (B) Metode Difusi Agar-Sumuran (C) Metode Difusi Agar-Plug

2.8.2 Metode Dilusi

2.8.2.1 Dilusi Kaldu (*Broth Dillution*)

Mikrodilusi atau makrodilusi adalah salah satu metode pengujian kerentanan antimikroba yang paling dasar. Prosedur metode ini melibatkan pembuatan dilusi dua kali lipat agen antimikroba (misalnya 1, 2, 4, 8, 16 dan 32 mg/mL) dalam media pertumbuhan cair yang disalurkan dalam tabung yang berisi volume minimum 2 mL (makrodilusi) atau dengan volume yang lebih kecil menggunakan pelat mikrotitrasi 96 lubang (mikrodilusi). Kemudian, setiap tabung atau sumur diinokulasi dengan inokulum mikroba yang disiapkan dalam media yang sama setelah pengenceran suspensi mikroba standar yang disesuaikan dengan skala 0,5 McFarland. Setelah pencampuran telah dilakukan, selanjutnya diinkubasi (kebanyakan tanpa agitasi) dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji (Balouiri *et al.*, 2016).



Gambar 2.9 Persiapan inokulum mikroba 0.5 McFarland (Balouiri et al., 2016)

Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah agen antimikroba yang sepenuhnya menghambat pertumbuhan organisme dalam tabung atau sumur mikrodilusi seperti yang terdeteksi oleh mata tanpa peralatan. Tidak seperti metode mikrodilusi, kelemahan utama dari metode makrodilusi adalah risiko kesalahan dalam persiapan larutan antimikroba untuk setiap tes, serta jumlah reagen dan ruang yang dibutuhkan relatif besar. Dengan demikian, metode mikrodilusi lebih reproduktif dan ekonomis (Jorgensen dan Ferraro, 2009).

Penentuan titik akhir KHM, digunakan perangkat yang dapat memfasilitasi pembacaan tes mikrodilusi dan hasil perekaman dengan kemampuan tinggi untuk membedakan pertumbuhan mikroba di sumur. Beberapa metode kolorimetri berdasarkan penggunaan reagen pewarna telah dikembangkan. *Tetrazolium salts*, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dan 2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino) karbonil]-2H-tetrazolium-hydroxide} (XTT), sering digunakan dalam penentuan titik akhir KHM untuk tes mikrodilusi antijamur dan antibakteri. Pewarna Alamar biru (*resazurin*) merupakan indikator pertumbuhan yang efektif (Balouiri et al., 2016).



2.8.2.2 Dilusi Agar (*Agar Dillution*)

Metode dilusi agar melibatkan penggabungan berbagai konsentrasi yang diinginkan dari antimikroba ke dalam media agar (media agar cair), umumnya menggunakan pengenceran dua-seri, diikuti dengan inokulasi inokulum mikroba pada permukaan pelat agar. Titik akhir KHM dicatat sebagai konsentrasi terendah agen antimikroba yang sepenuhnya menghambat pertumbuhan dalam kondisi inkubasi yang sesuai (Balouiri *et al.*, 2016).

Teknik ini cocok untuk pengujian kerentanan antibakteri dan antijamur. Dalam penentuan KHM, metode dilusi agar lebih disukai daripada *broth dillution* apabila beberapa isolat diuji terhadap senyawa tunggal, atau jika senyawa (atau ekstrak) yang diuji menutupi deteksi pertumbuhan mikroba dalam media cair dengan pewarnaannya. Dilusi agar sering direkomendasikan sebagai metode standar untuk beberapa organisme seperti anaerob dan spesies *Helicobacter* (CLSI, 2010).

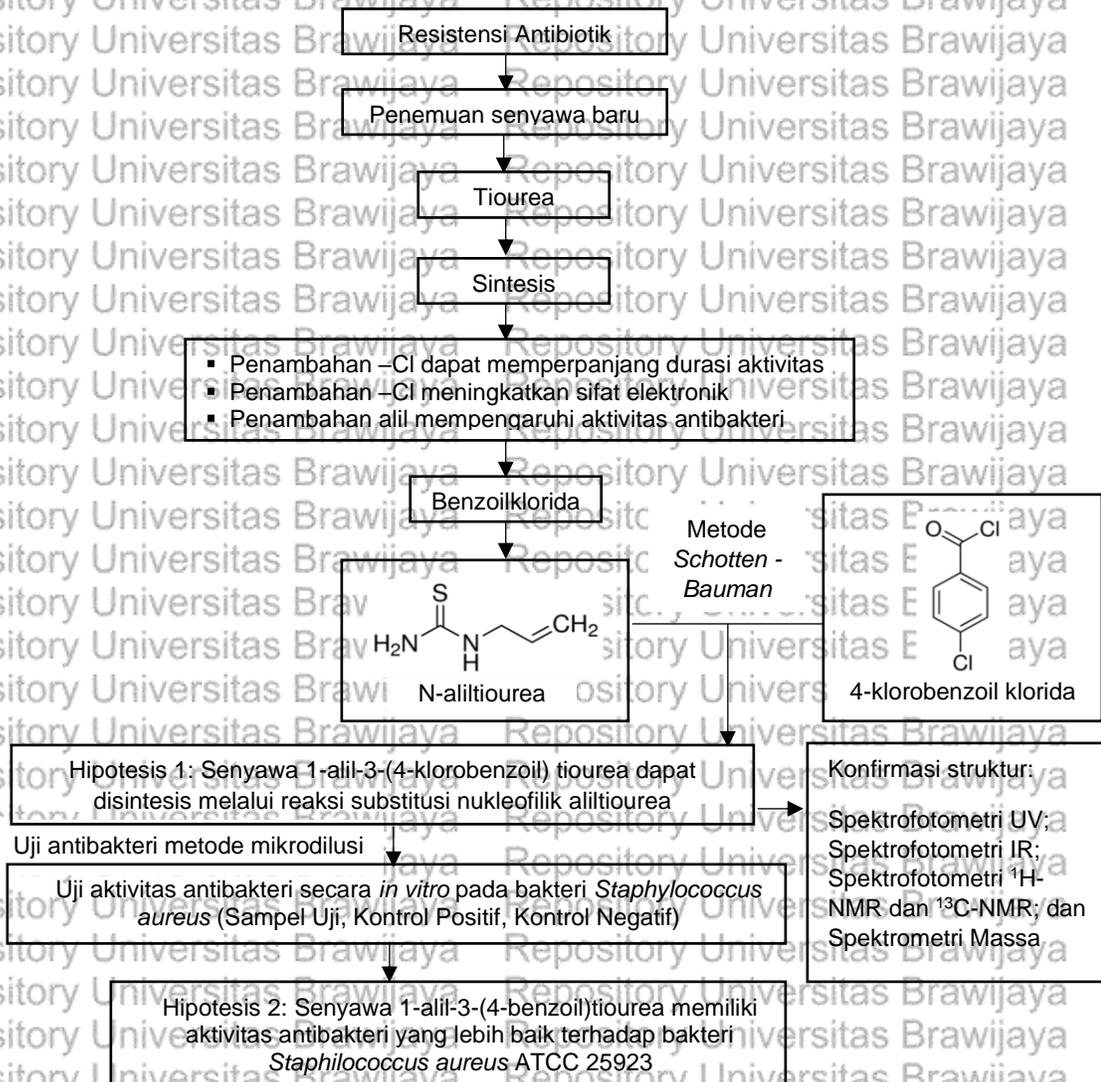
Persiapan inokulum standar untuk metode dilusi agar dengan cara menumbuhkan mikroorganisme sesuai standar *McFarland 0,5*, atau mensuspensi koloni secara langsung untuk mencapai densitas yang sama. Persiapan inokulum awal dan pengenceran akhir dapat berbeda-beda. Pengenceran suspensi inokulum dengan melakukan kultur yang disesuaikan dengan standar *McFarland 0,5* yang mengandung sekitar $1-2 \times 10^8$ CFU/mL dengan sebagian besar spesies, dan inokulum akhir yang dibutuhkan adalah 10^4 CFU per spot berdiameter 5-8 mm. Ketika menggunakan replikator dengan *pin* berukuran 3-mm yang akan menghasilkan 2- μ L, suspensi *McFarland 0,5* diencerkan 1:10 dalam *broth* steril atau larutan salin untuk



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Berdasarkan kerangka konsep diatas, dikatakan bahwa dari saat ini telah banyak terjadi resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik disebabkan karena penggunaan antibiotik yang meluas dan irrasional, tidak berdasarkan indikasi, rendahnya kepatuhan, terdapat kecenderungan antibiotik dibeli bebas atau tanpa resep dokter maupun kurang adekuatnya antibiotik yang diberikan. Oleh karena itu, pengembangan obat antibiotik kian berkembang, untuk dapat memperoleh senyawa yang memiliki efek antibakteri yang lebih baik dari antibiotik saat ini dan mampu mengobati resistensi antibiotik. Untuk memperoleh senyawa baru yang akan berpotensi sebagai calon obat, diperlukan suatu proses modifikasi struktur senyawa, melalui reaksi sintesis secara kimia, untuk memperoleh senyawa baru yang relatif murni.

Pada penelitian terdahulu ditemukan bahwa senyawa tiourea dan turunannya dapat memberikan efek dan mempunyai aktivitas biologis yang luas; sebagai antivirus, antijamur, antibakteri, maupun aktivitasnya sebagai analgesik dan anti-inflamasi. Disini peneliti berfokus pada aktifitas antibakteri dari senyawa turunan benziltiourea, yang memiliki sifat fisika kimia yang lebih baik daripada obat antibakteri yang sudah ada, salah satunya yaitu antibiotik golongan aminoglikosida, gentamisin. Senyawa aliltiourea direaksikan dengan turunan benzoilklorida yaitu 4-klorobenzoilklorida menggunakan prinsip reaksi substitusi nukleofilik sehingga menghasilkan senyawa yang diinginkan. Menurut Halim dan Zainab (2016), turunan tiourea memiliki potensi sebagai prekursor yang cocok untuk berbagai sintesis senyawa baru, dikarenakan memiliki dua gugus amina primer yang reaktif. Pada penelitian ini, digunakan bis(tiourea) yang diperkirakan memiliki aktivitas antibakteri



yang lebih baik dibanding turunan monotiourea, dikarenakan keberadaan dua gugus tiourea. Turunan Bis(tiourea) (2a-c) disubstitusi dengan rantai alkil C_{10} , C_{12} , dan C_{14} .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh nilai Kadar Hambar Minimum (KHM) turunan Bis(tiourea) 2a dan 2b dengan substitusi C_{10} dan C_{12} masing-masing $135\mu\text{g/mL}$ dan $145\mu\text{g/mL}$, yang menunjukkan hasil yang baik, jika dibandingkan dengan antibiotik pembanding ampisilin sebesar $108\mu\text{g/mL}$. Di sini peneliti akan berfokus pada aktivitas antibakteri dari senyawa turunan benziltiourea 1-*alil*-3-(4-klorobenzoil) tiourea, dengan metode sintesis *Schotten-Baumann*.

Metode sintesis *Schotten-Baumann* merupakan penambahan basa yang digunakan untuk menghasilkan ekuilibrium dalam pembentukan amida dari amina dan asam klorida, yang sudah dimodifikasi melalui reaksi substitusi nukleofilik (benzoilasi) (Wang, 2010). Penambahan rantai alkil dikatakan dapat meningkatkan lipofilisitas dan aktivitas biologis senyawa turunan tiourea. Sifat lipofilik ini meningkatkan kemampuan penetrasi pada mikroorganisme melalui lapisan lipid membran sel (Arslan *et. al.*, 2009). Penambahan gugus halogen yang merupakan gugus penarik elektron, akan meningkatkan sifat elektronik senyawa sehingga memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor, selain itu gugus halogen juga memiliki tiga efek utama yaitu efek sterik, elektronik, dan obstruktif, sehingga diharapkan dapat menyebabkan perubahan aktivitas biologis. Penambahan gugus 4-klorobenzoil yang diperoleh dari turunan benzoil klorida merupakan senyawa yang diharapkan dapat memperpanjang durasi aktivitas dan meningkatkan sifat elektronik senyawa (Siswandono, 1999). Kemudian hasil sintesis akan dikonfirmasi strukturnya menggunakan Spektrofotometri UV,



Spektrofotometri IR, Spektrofotometri ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR, dan Spektrometri Massa.

Setelah dilakukan konfirmasi struktur dan diperoleh senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea, kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode dilusi agar.

Metode dilusi adalah metode yang paling tepat untuk penentuan nilai KHM, karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media *broth* (makrodilusi atau mikrodilusi). Nilai KHM yang dicatat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$ atau mg/L (Balouri *et al.*, 2016). Pada penelitian ini digunakan antibiotik pembanding gentamisin, golongan aminoglikosida. Gentamisin bekerja dengan berikatan dengan ribosomal subunit 30s dan 50s pada bakteri dan menghambat sintesis proteinnya sehingga terjadi kerusakan pada membran sel bakteri. Obat ini efektif terhadap bakteri gram-positif seperti spesies *Staphylococcus* dan beberapa bakteri gram negatif (Katzung, 2010). Menurut USP (2013), penggunaan Gentamisin sebagai kontrol positif terhadap bakteri memiliki nilai KHM sebesar 0,12 – 1 mcg/mL.

Dilihat dari nilai KHM yang ≥ 4 mcg/mL maka dikatakan antibiotik gentamisin sensitif (*susceptible*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



3.2 Hipotesis penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

3.2.1 Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea terhadap 4-klorobenzoil klorida.

3.2.2 Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea memiliki aktivitas antimikroba yang lebih baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dibandingkan dengan antibiotik gentamisin.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) dimana ditentukan variabel bebas yang kemudian diukur efeknya pada variabel terikat. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris dengan melakukan sintesis, dan uji aktivitas antibakteri senyawa secara *in vitro* pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.2 Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea yang didapatkan dari hasil sintesis.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari tiga bagian yaitu :

- Variabel bebas: Dosis senyawa uji
- Variabel terikat: Kadar Hambat Minimal (KHM)



- Variabel kontrol: Metode sintesis (*Schotten-Baumann*), pelarut sintesis, pereaksi sintesis, metode uji aktivitas antibakteri (dilusi agar), pelarut, suhu, waktu, media agar, media cair.

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September 2019 hingga bulan Juli 2020.

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Bahan

Alitiourea (Sigma Aldrich), 2- klorobenzoil klorida (Sigma Aldrich), tetrahidrofuran (Sigma Aldrich), etil asetat p.a, metanol teknis, n-heksana p.a, trietilamin (Sigma Aldrich), kloroform teknis, karagenan (Sigma Aldrich), media *Muller Hilton Broth* (MERCH), *Nutrient Agar* (MERCK), biakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Tween-80 p.a, *Water For Injection* (WFI), dan antibiotik Gentamisin Injeksi 40 mg/mL.

4.5.2 Alat

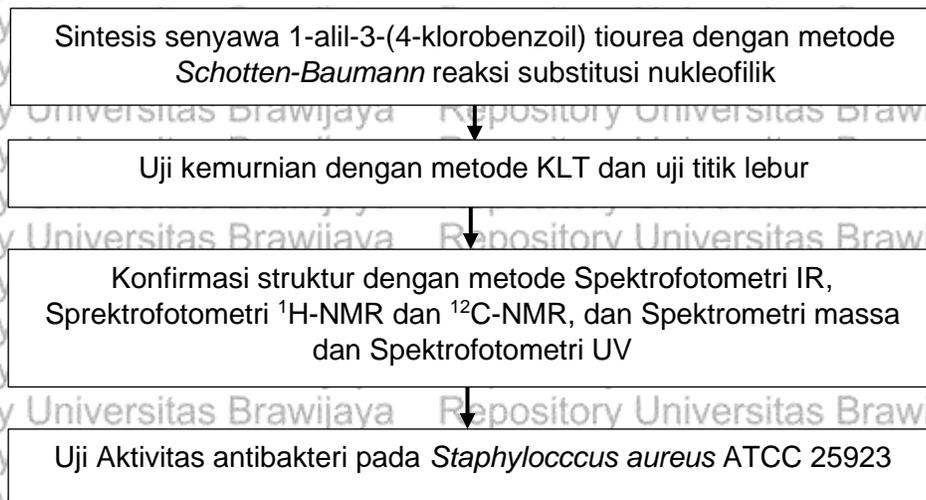
Satu set peralatan refluks, timbangan analitik (PA224 OHAUS), pengaduk magnetik dengan Hotplate (IKA C-Mag HS7), seperangkat alat KLT, Spektrofotometer UV (Shimadzu UV-Vis 1800); Spektrofotometer FTIR (8400S/Shimadzu); Spektrofotometer NMR (NMR Jeol ICS 400 MHz); Spektrometer LC/MS (*Refurbished Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS*), alat alat gelas, mikropipet, kulkas, oven.



4.6 Definisi Operasional

- 1) Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri yang diperoleh dari stok kultur Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.
- 2) Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea didapatkan dari metode reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea.
- 3) Metode pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan metode dilusi agar, kemudian dilihat Kadar Hambat Minimal (KHM) yakni konsentrasi sampel terkecil yang dapat membunuh bakteri.
- 4) Kontrol positif dan negatif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antibiotik gentamisin dan larutan Tween-80 0,4%.

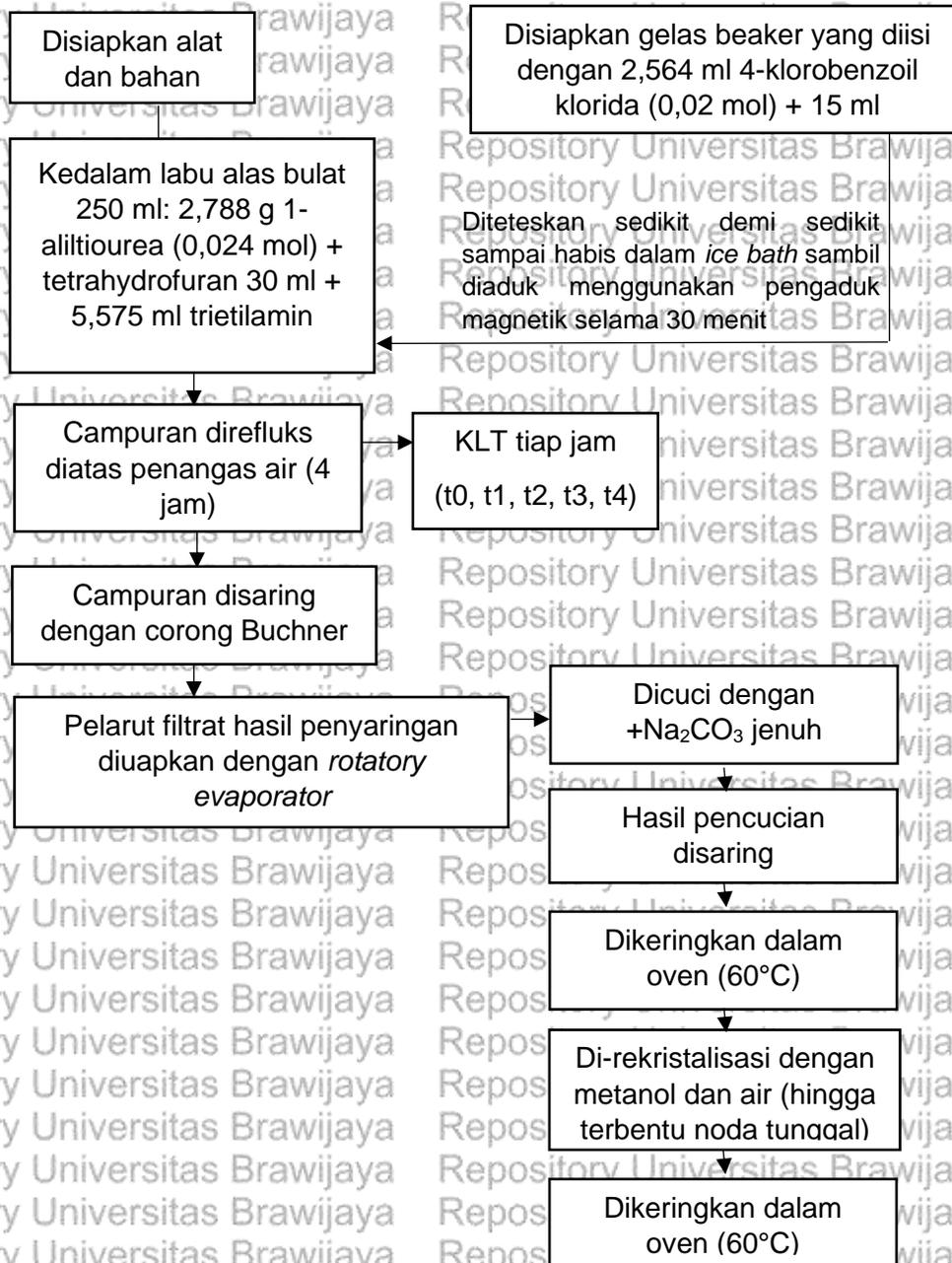
4.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian



4.7.1 Sintesis senyawa

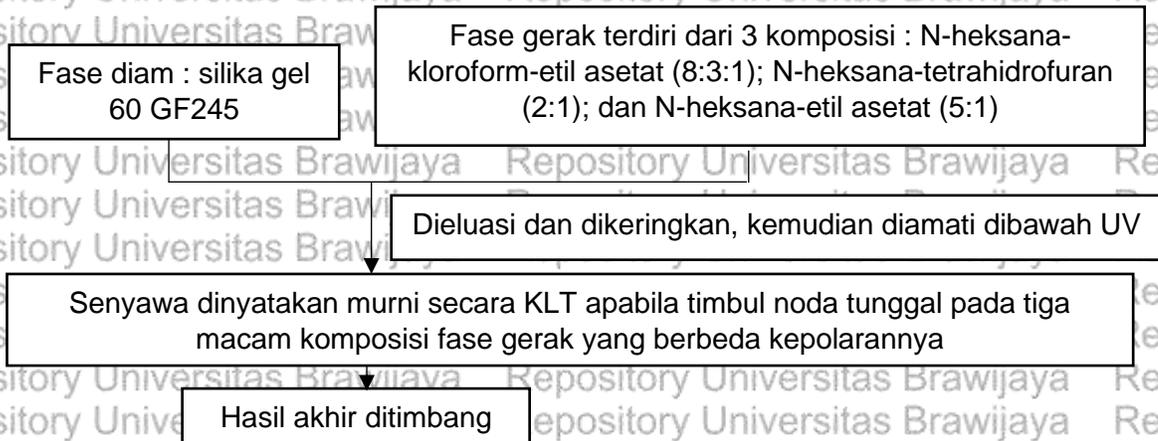


Gambar 4.2 Prosedur Sintesis Senyawa 1-ali-3-(4-klorobenzoil) tiourea



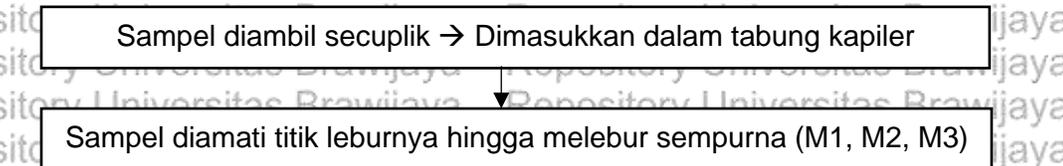
4.7.2 Uji Kemurnian

4.7.2.1 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Gambar 4.3 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT

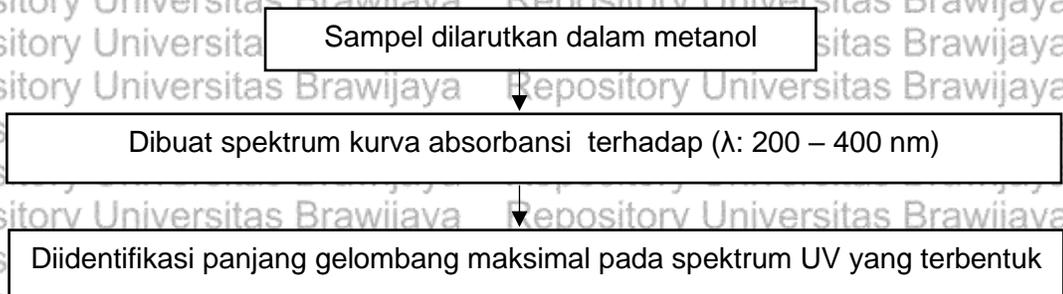
4.7.2.2 Uji Rentang Titik Lebur



Gambar 4.4 Prosedur Uji Rentang Titik Lebur

4.7.3 Uji Konfirmasi Struktur

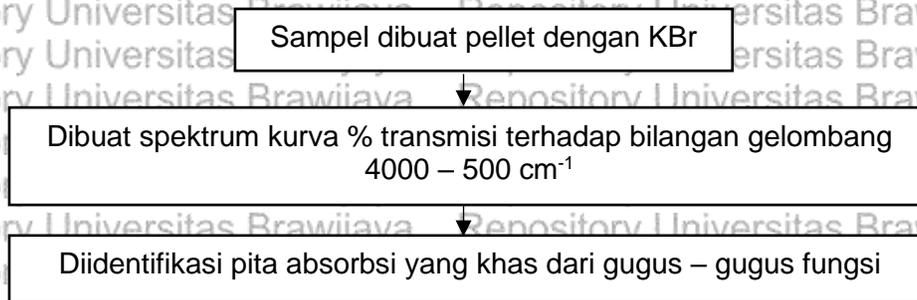
4.7.3.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri UV



Gambar 4.5 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer UV

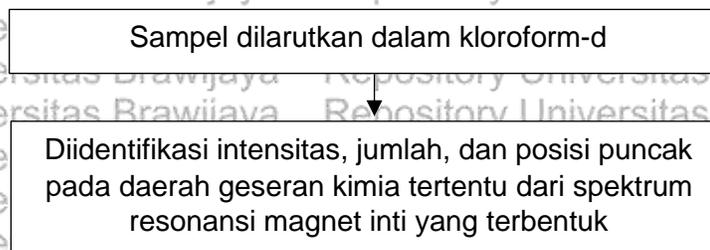


4.7.3.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Infrared (IR)



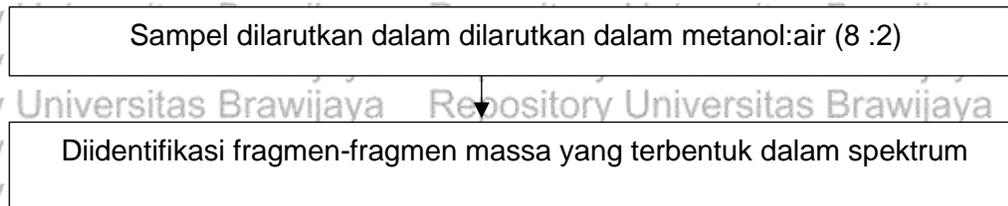
Gambar 4.6 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR

4.7.3.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri ¹H-NMR dan ¹³C-NMR



Gambar 4.7 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Magnet Inti

4.7.3.4 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa



Gambar 4.8 Prosedur Studi Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometri Massa

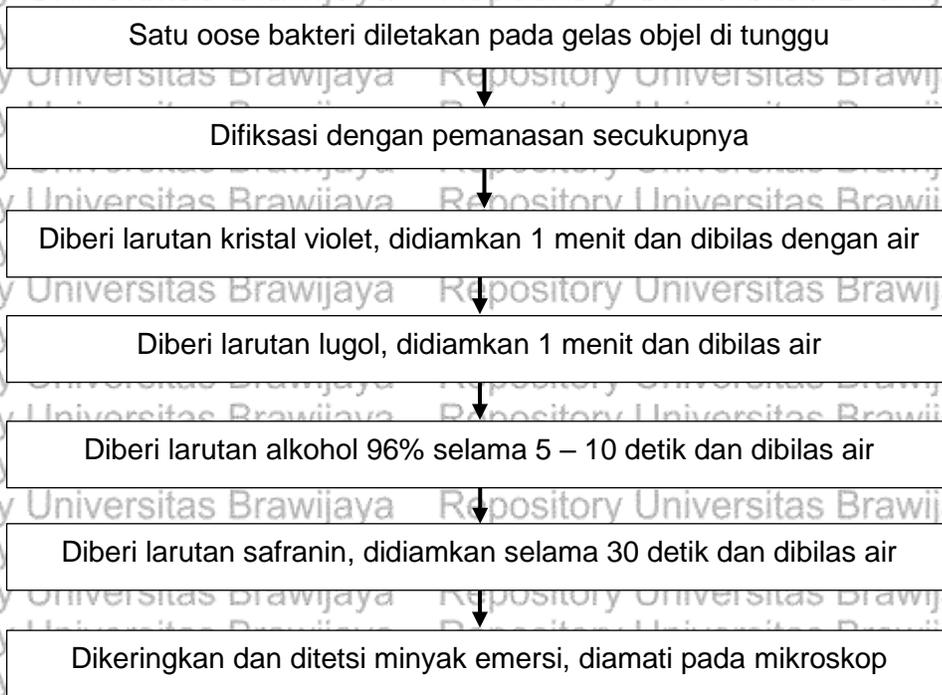


4.7.4 Uji Antibakteri Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

4.7.4.1 Identifikasi Bakteri

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada *Natrium Agar Plate* (NAP), diinkubasi dalam inkubator sealam 18 – 24 jam pada suhu 37°C.

4.7.4.1.1 Pewarnaan Gram



Gambar 4.9 Prosedur Pewarnaan Gram



4.7.4.1.2 Uji Koagulase

Dilakukan penyiapan media plasma 1-2 tetes pada gelas objek

Dengan menggunakan ose, koloni diambil dari media *Nutrient Agar* lalu dicampurkan dengan reagen *Staphaurex*

Diamati langsung reaksi yang terjadi, dikatakan positif apabila terjadi penggumpalan atau aglutinasi

Gambar 4.10 Prosedur Uji Koagulase

4.7.4.1.3 Uji Katalase

Diambil koloni bakteri dari media *Nutrient Agar* (NA)

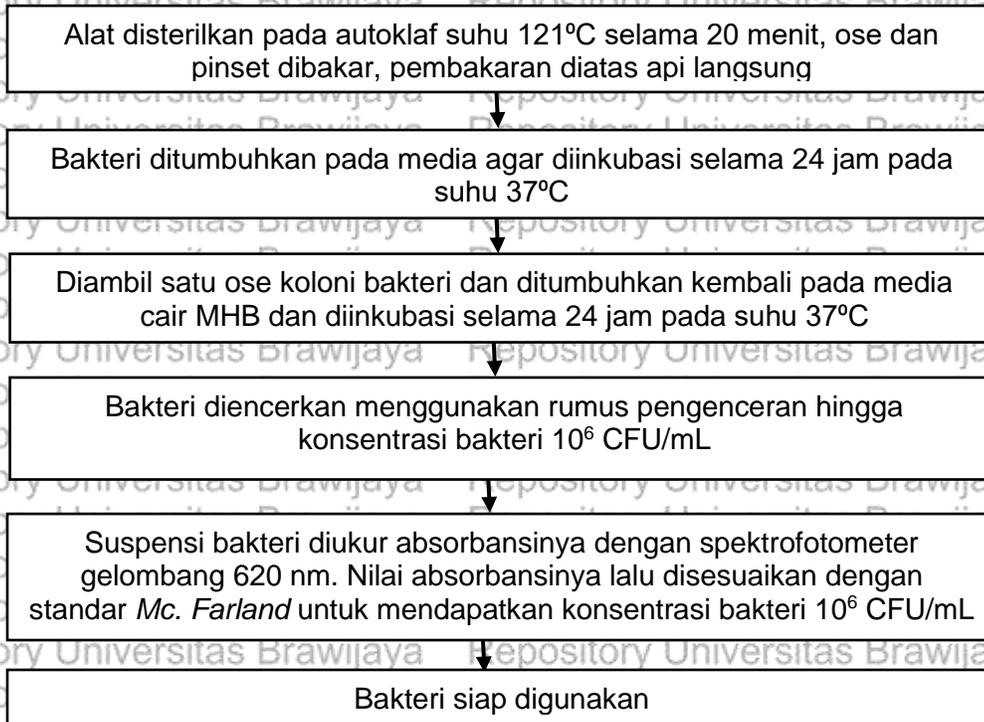
Digoreskan pada *slide glass*

Ditambahkan larutan H_2O_2 , dikatakan positif apabila terdapat gelembung udara

Gambar 4.11 Prosedur Uji Katalase



4.7.4.2 Preparasi Kultur Bakteri



Gambar 4.12 Prosedur Kultur Bakteri



4.7.4.3 Preparasi Larutan Uji dan Kontrol

4.7.4.3.1 Sampel Uji BATU-4

Sampel uji tiap produk sintesis ditimbang 62,5 mg → ad labu ukur 25 mL
(2.500 ppm)

Larutan induk diencerkan $\frac{1}{2}$ kalinya ad labu ukur 25 mL sebanyak 7x

Dilakukan konsentrasi 1000;500;250;125;62,5;31,25;15,625;7,8125 ppm

Dipipet masing-masing 4 mL → Dibuat replikasi 3x

Gambar 4.13 Prosedur Preparasi Sampel Uji

4.7.4.3.2 Kontrol Positif

Gentamisin Injeksi 40 mg/mL → Dipipet 0,195 mL ad labu ukur 25 mL
(312,5 ppm)

Larutan induk diencerkan $\frac{1}{2}$ kalinya ad labu ukur 25 mL sebanyak 4x

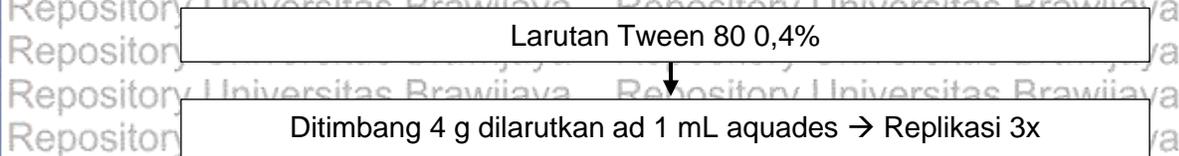
Dilakukan konsentrasi 125;62,5;31,25;15,625;7,8125 ppm

Dipipet masing-masing 4 mL → Dibuat replikasi 3x

Gambar 4.14 Prosedur Preparasi Larutan Uji

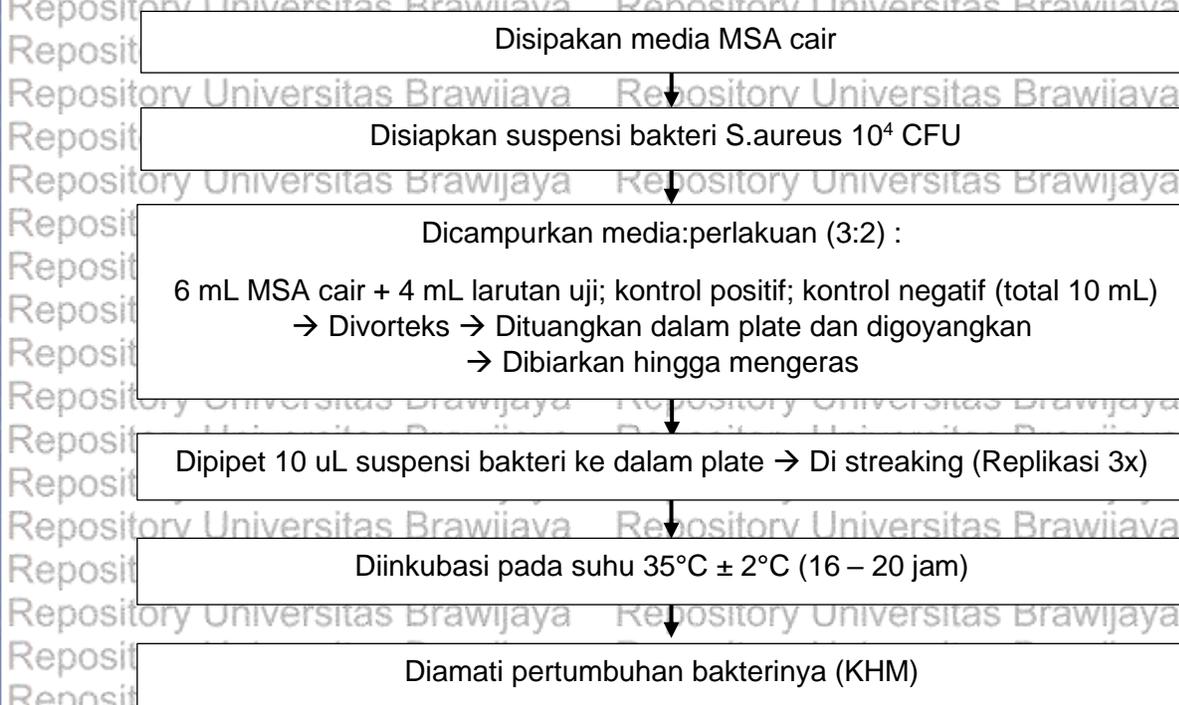


4.7.4.3.3 Kontrol Negatif (-)



Gambar 4.15 Prosedur Preparasi Kontrol Negatif (-)

4.7.4.4 Uji Dilusi Agar



Gambar 4.16 Prosedur Uji Dilusi Agar

4.8 Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah uji aktivitas antibakteri. Nilai kadar hambat minimum (KHM) diperoleh dari hasil dilusi agar, yakni konsentrasi sampel



terkecil yang dapat membunuh bakteri. Konsentrasi sampel terkecil yang membunuh bakteri dapat dilihat melalui pengamatan visual pada plate agar, tampak dari tumbuh tidaknya koloni bakteri *Staphylococcus aureus* berwarna putih keemasan dan perubahan warna pada media MSA (*Manitol Salt Agar*).



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Sintesis Senyawa BATU-4

Penelitian diawali dengan melakukan sintesis senyawa BATU-4. Rendemen produk dapat dilihat pada Tabel 5.1. Perhitungan rendemen hasil sintesis dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat nyata}}{\text{Berat teoritis}} \times 100\%$$

Tabel 5.1 Persen Rendemen BATU-4

Alitiourea	4-klorobenzoil klorida	Mol Produk	MR Produk	Berat Teoritis	Berat Nyata	Rendemen
0,024 mol	0,02 mol	0,02 mol	254,74 g/mol	5,0948 g	1,6376 g	11,336 %

Ciri organoleptis kristal BATU-4 dapat dilihat pada Tabel 5.2, dan produk kristal senyawa BATU-4 dapat dilihat pada Gambar 5.1

Tabel 5.2 Ciri Organoleptis BATU-4

Bentuk	Warna	Bau
Kristal jarum	Putih kekuningan	Spesifik



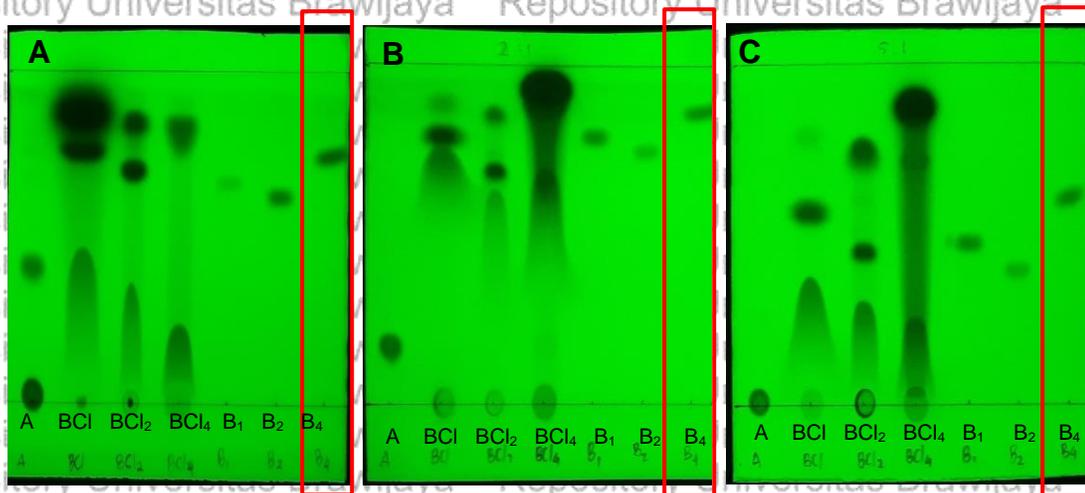
Gambar 5.1 Kristal Makroskopis BATU-4

5.1.2 Uji Kemurnian Senyawa BATU-4

5.1.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kemurnian senyawa hasil sintesis diuji dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT), dengan fase diam *silica gel* 60 GF254, dan 3 fase gerak yang berbeda; (a) n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1); (b) n-heksana : tetrahidrofur (2:1); (c) n-heksana : etil asetat (5:1). Hasil KLT pada setiap fase gerak B₄ menunjukkan noda tunggal dengan R_f berturut-turut sebesar 0,733; 0,867; 0,600 yang dapat dilihat pada

Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Uji KLT BATU-4

Keterangan : (A) n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1); (B) n-heksana : tetrahidrofur (2:1); (C) n-heksana : etil asetat (5:1)



5.1.2.2 Uji Rentang Titik Lebur Senyawa BATU-4

Selain dengan metode KLT, kemurnian senyawa dapat dilihat rentang titik leburnya. Rentang titik lebur diuji dengan *Mel Temp Electrothermal Melting Point Apparatus* dengan tiga kali replikasi. Hasil uji rentang titik lebur senyawa BATU-4 dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.3 Uji Rentang Titik Lebur BATU-4

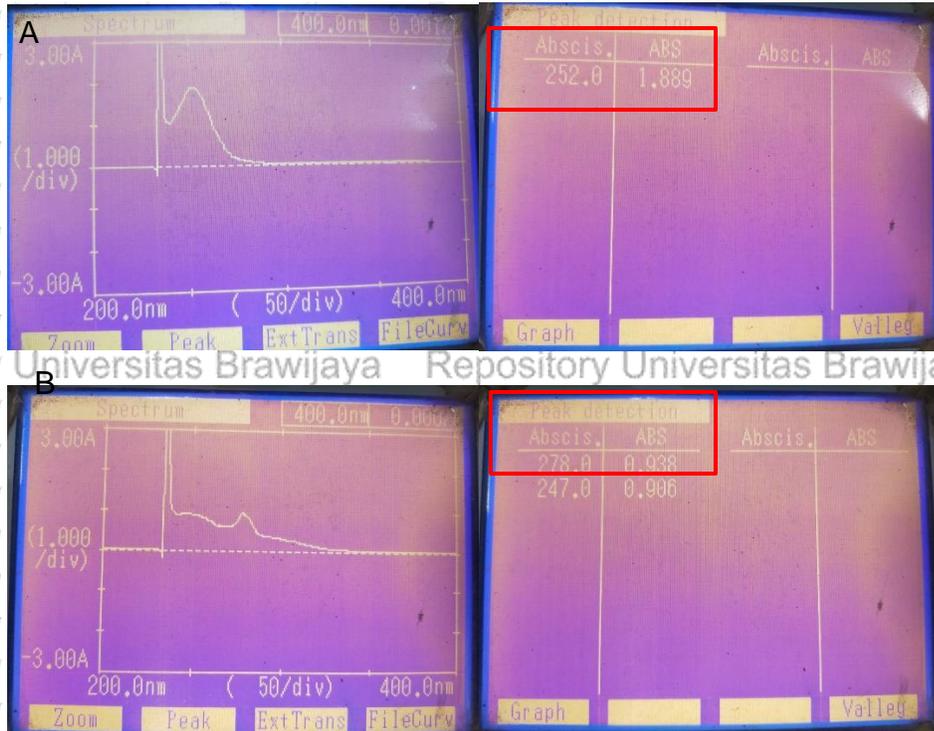
Percobaan	Rentang Titik Lebur		
	M_1 (°C)	M_2 (°C)	$(M_2 - M_1)$ (°C)
Ke-1	105,9	106,8	0,9
Ke-2	105,8	107,0	1,2
Ke-3	106,0	107,1	1,1
Rata-rata			1,067

Keterangan : (M_1) Suhu pertama kali melebur; (M_2) Suhu melebur sempurna

5.1.3 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-4

5.1.3.1 Spektrofotometri UV

Hasil uji konfirmasi struktur spektrofotometer UV *single beam* dengan THF sebagai pelaut dapat dilihat pada Gambar 5.3, senyawa n-alltiourea menunjukkan hasil satu *peak*, dengan panjang gelombang serta absorbansi alltiourea sebesar 252 nm dan 1,889. Sedangkan senyawa 1-all-3-(4-klorobenzoil) tiourea menunjukkan hasil 2 *peak*, dengan panjang gelombang dan absorbansi sebesar 247,0 nm, 278,0 nm dan 0,986; 0,936.



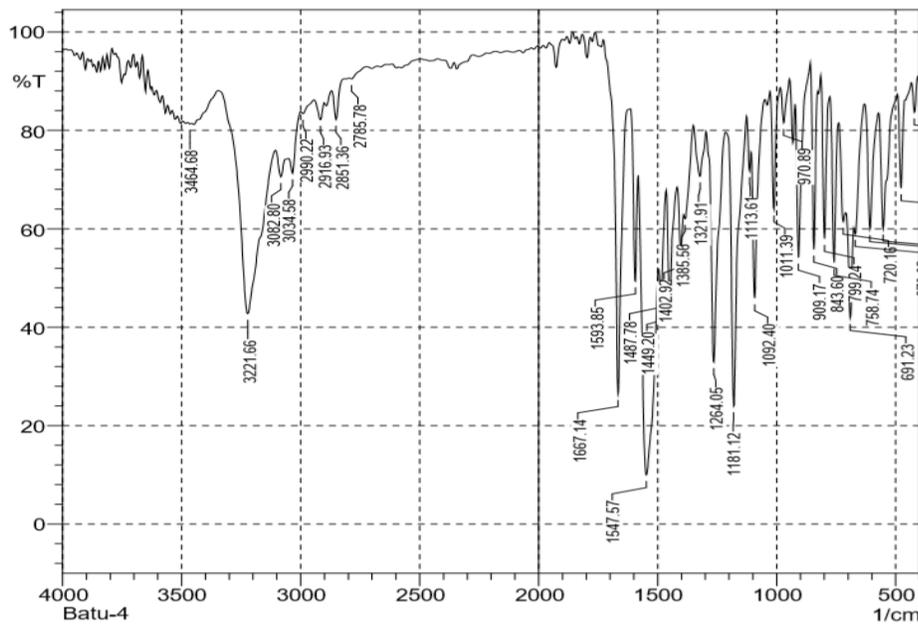
Gambar 5.3 Spektra UV BATU-4

Keterangan : Spektra dan absorbansi (A) alitiourea; (B) Senyawa BATU-4

Spektra UV senyawa alitiourea menunjukkan hasil satu peak, sedangkan senyawa BATU-4 menunjukkan hasil 2 peak. Berdasarkan hasil spektra UV tersebut menunjukkan bahwa produk sintesis telah sesuai.

5.1.3.2 Spektrofotometri IR

Hasil uji konfirmasi struktur senyawa BATU-4 dengan spektrofotometer IR dapat dilihat Gambar 5.4, dan interpretasi spektra IR dapat dilihat pada Tabel 5.4



Gambar 5.4 Spektra Inframerah Senyawa BATU-4

Tabel 5.4 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-4

Tipe Vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Rentang Bilangan Gelombang (Pavia, 2009) (cm ⁻¹)	Intensitas	Bentuk
C-Cl	799.24	785 - 540	Kuat	Tajam
C=S	1181.12	1450 - 757	Kuat	Tajam
C-N	1264.05	1350 - 1000	Kuat	Tajam
C=C Aromatis	1547.57-1487.78	1600 - 1475	Kuat	Tajam
C=C Alkena	1593.85	1680 - 1600	Medium	Tajam
C=O	1667.14	1690 - 1640	Kuat	Tajam
N-H (stretch)	3221.66	3500 - 3100	Kuat	Lebar

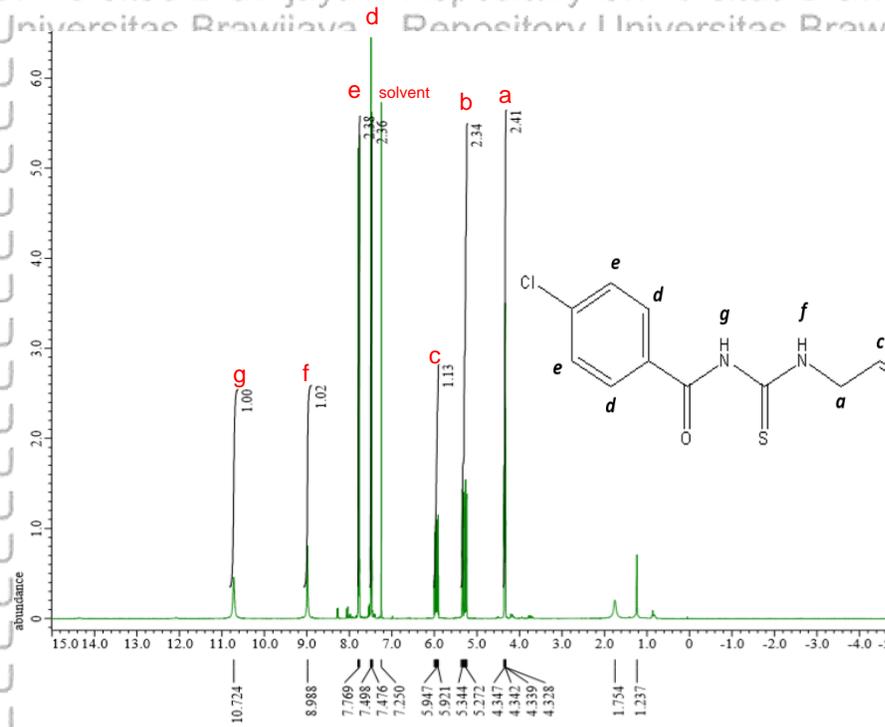
Berdasarkan gambar diatas didapatkan bahwa terdapat beberapa gugus penting yaitu -C=O ulur amida pada bilangan gelombang 1667,14 cm⁻¹; -C=C



aromatis pada bilangan gelombang 1181.12 cm^{-1} ; C=S pada bilangan gelombang 1181.12 cm^{-1} ; N-H ulur pada bilangan gelombang 3221.66 cm^{-1} ; C-N pada bilangan gelombang 1264.05 cm^{-1} ; C-Cl pada bilangan gelombang 799.24 cm^{-1} .

5.1.3.3 Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$)

Hasil uji konfirmasi struktur dengan pelarut kloroform-d pada spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan interpretasi spektranya pada Tabel 5.5. Untuk hasil spektra $^{13}\text{C-NMR}$ dapat dilihat pada Gambar 5.6 dan interpretasi spektra pada Tabel 5.5

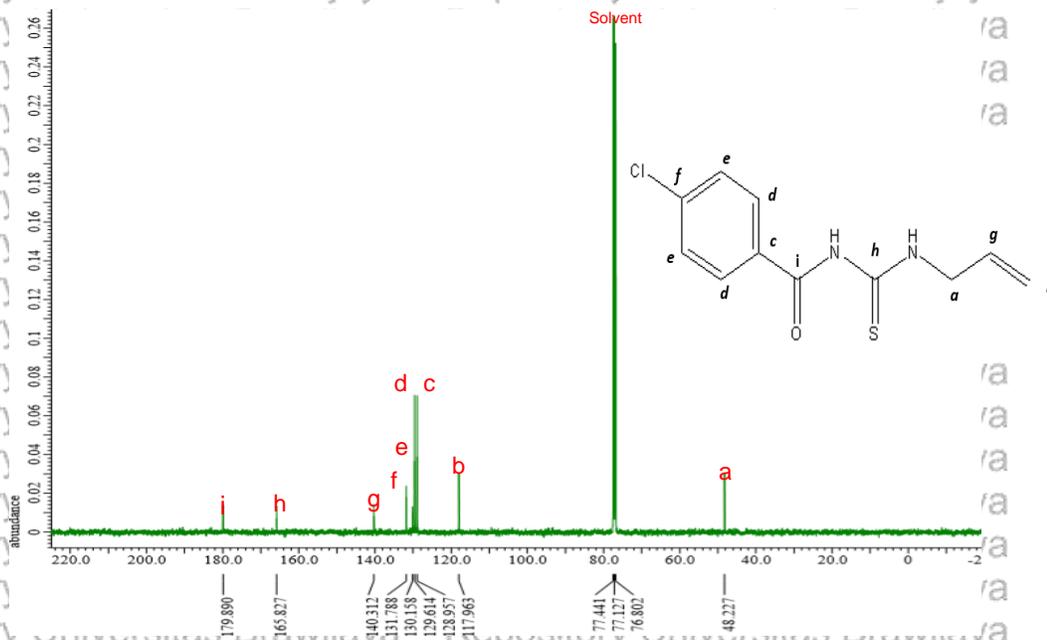


Gambar 5.5 Spektra $^1\text{H-NMR}$ Senyawa BATU-4

Tabel 5.5 Interpretasi Spektra $^1\text{H-NMR}$ Senyawa BATU-4

Atom H	Geseran Kimia δ (ppm)	Perbandingan Integrasi	Multiplikasi	Jenis Proton
a	4,328–4,347	2	Multiplet	2 atom H dari alil
b	5,272–5,344	2	Multiplet	2 atom H dari alil
c	5,921–5,947	1	Doublet	1 atom H dari alil
d	7,476–7,498	2	Multiplet	2 atom H dari benzena
e	7,769	2	Doublet	2 atom H dari benzena
f	8,988	1	Singlet	1 atom H dari -NH
g	10,724	1	Singlet	1 atom H dari -NH

Berdasarkan hasil interpretasi, terdapat 7 jenis proton dengan lingkungan kimia yang berbeda dalam senyawa produk sintesis.

Gambar 5.6 Spektra $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa BATU-4

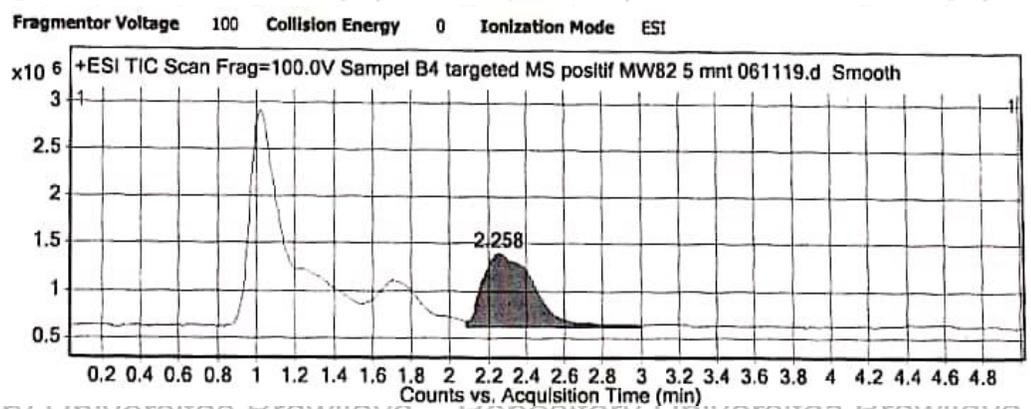
Tabel 5.6 Interpretasi Spektra ^{13}C -NMR Senyawa BATU-4

Atom	Geseran Kimia	Jenis karbon	Geseran Kimia Referensi (Pavia, 2009) δ (ppm)
C	δ (ppm)		
a	48.227	1 atom C dari $-\text{C}=\text{C}$	0-50 ppm
b	117.963	1 atom C dari $\text{C}=\text{C}$	100-150 ppm
c	128.957	1 atom C dari benzena	110-175 ppm
d	129.614	2 atom C dari benzena	110-175 ppm
e	130.158	2 atom C dari benzena	110-175 ppm
f	131.788	1 atom C dari benzena	110-175 ppm
g	140.312	1 atom C dari $-\text{C}=\text{C}$	100-150 ppm
h	165.827	1 atom C dari $\text{C}=\text{S}$	155-185 ppm
i	179.890	1 atom C dari $\text{C}=\text{O}$	155-185 ppm

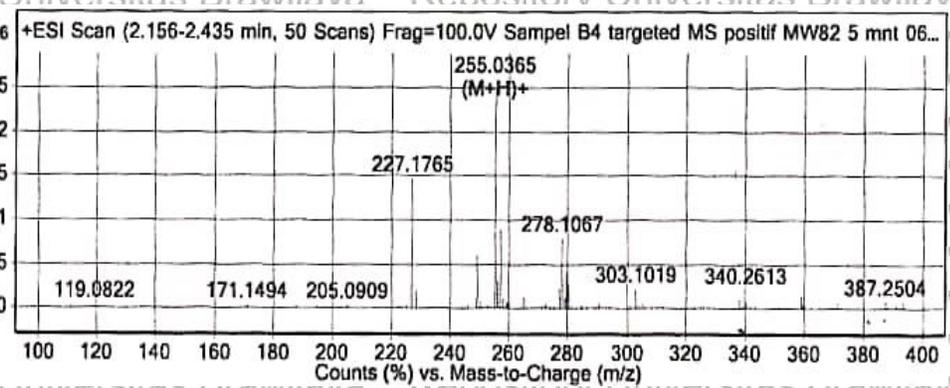
Berdasarkan hasil interpretasi, terdapat 9 jenis carbon dengan lingkungan kimia yang berbeda dalam senyawa produk sintesis.

5.1.3.4 Spektrometri Massa

Uji konfirmasi struktur spektrometri massa dilakukan dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS). Data kromatografi cair senyawa BATU-4 dapat dilihat pada Gambar 5.7. Hasil spektra spektrometri massa senyawa BATU-4 dapat dilihat pada Gambar 5.8 dan analisa fragmen massa dari hasil uji MS dapat dilihat pada Tabel 5.8.



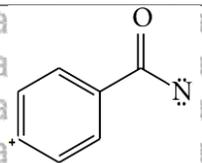
Gambar 5.7 Kromatografi Senyawa BATU-4



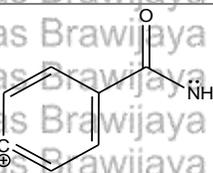
Gambar 5.8 Spektra Spektroskopi Massa Senyawa BATU-4

Tabel 5.7 Interpretasi Spektra Spektrofotometri Massa Senyawa BATU-4

Struktur	Interpretasi (m/z)
	255.0365
	227.1765



171.0822



119.082

Hasil uji spektrometri massa senyawa BATU-4 dengan metanol – air (80% - 20%) sebagai pelarut menunjukkan terbentuknya 4 fragmen massa yaitu 199.0822; 171.0822; 227.1765; dan 255.0365 m/z yang merupakan fragmen massa dari senyawa BATU-4.

Berdasarkan hasil uji konfirmasi struktur senyawa BATU-4 dengan spektrofotometri UV, spektrofotometri IR, spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan spektrometri massa, menunjukkan bahwa sintesis senyawa telah berhasil, senyawa BATU-4 benar merupakan senyawa 1-allyl-3-(4-klorobenzoyl) tiourea.

5.1.4 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-allyl-3-(4-klorobenzoyl) tiourea

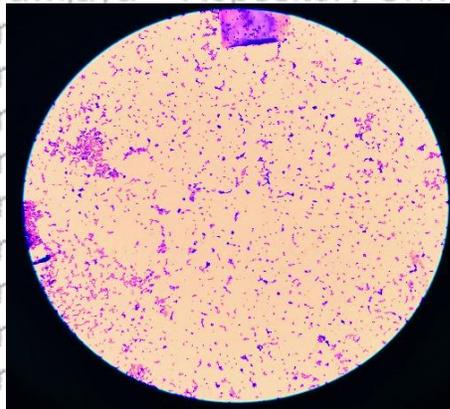
Penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Sebelum melakukan uji antibakteri, dilakukan identifikasi bakteri.



5.1.4.1 Identifikasi Bakteri

5.1.4.1.1 Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan gram, didapatkan bahwa sampel bakteri berwarna ungu dengan bentuk kokus (bulat) atau menyerupai anggur yang menunjukkan ciri dari bakteri gram positif seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9 Pewarnaan Gram

5.1.4.1.2 Uji Katalase

Hasil uji katalase menunjukkan hasil positif, sampel bakteri adalah *Staphylococcus aureus*. Reaksi yang terjadi setelah bakteri ditambahkan larutan hidrogen peroksida menunjukkan terbentuknya gelembung udara, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.10.



Gambar 5.10 Uji Katalase



5.1.4.1.3 Uji Koagulase

Hasil uji koagulase menunjukkan hasil positif, bahwa sampel bakteri benar dari genus *Staphylococcus* karena terdapat penggumpalan atau aglutinasi, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11 Uji Koagulase

5.1.4.2 Uji Antibakteri (Dilusi Agar)

Selanjutnya dilakukan uji antibakteri untuk mengetahui profil aktivitas antibakteri. Metode yang digunakan yaitu dilusi agar dengan media MSA (*Manitol Salt Agar*) untuk mendapatkan Kadar Hambar Minimum (KHM). Hasil uji antibakteri dari senyawa uji dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Sampel Uji dan Kontrol

Perlakuan	Konsentrasi			Replikasi			
	(ppm)	1	2	3	1	2	3
Sampel Uji	1000	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-	-



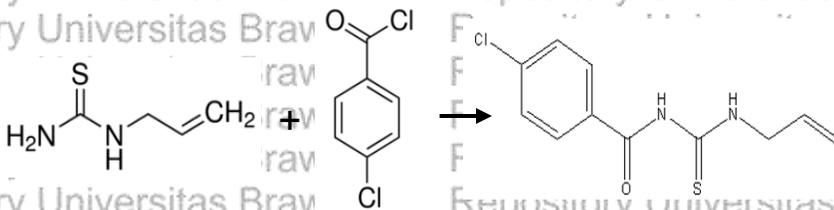
BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

6.1.1 Sintesis Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

Penelitian ini diawali dengan proses sintesis senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea dengan metode *Schotten-Baumann* melalui reaksi substitusi nukleofilik. Metode sintesis *Schotten-Baumann* merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida, dengan adanya penambahan basa berupa TEA, yang digunakan untuk menghasilkan ekuilibrium dalam pembentukan amida dari amina dan asam klorida, yang dimodifikasi melalui reaksi substitusi nukleofilik (benzoilasi) (Wang, 2010).

Mekanisme reaksi pembentukan senyawa dapat dilihat pada Gambar 6.1:



Gambar 6.1 Reaksi Substitusi Nuleofilik

Setelah dilakukan proses sintesis, didapatkan hasil senyawa berbentuk kristal dengan warna putih kekuningan sebesar 0,1058 gram, dengan persentase rendemen sebesar 11,336%. Nilai rendemen dari hasil produk dapat terbilang sedikit. Hal tersebut dapat dikarenakan reaksi sintesis senyawa yang belum selesai (*incomplete*), maupun terjadinya reaksi samping yang tidak diinginkan. Selain itu ini dapat disebabkan karena ketika proses pencucian dengan Na₂CO₃ serta proses



71
rekristalisasi dengan metanol dan air banyak produk yang terbuang, serta hilangnya sampel karena menempel pada alat yang digunakan. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi dari reaksi kimia antara lain konsentrasi reaktan, suhu, bentuk dan dispersi reaktan, pelarut, dan adanya katalis (Solomons *et al.*, 2014).

6.1.2 Uji Kemurnian Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

Produk hasil sintesis kemudian diuji kemurnian untuk memastikan senyawa telah bebas dari zat pengotor dan untuk mengetahui kemurnian dari senyawa yang dihasilkan. Uji kemurnian ini dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji rentang titik lebur.

Uji KLT menggunakan fase gerak (a) n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1); (b) n-heksana : tetrahidrofuran (2:1); (c) n-heksana : etil asetat (5:1) dan fase diam berupa silika gel 60 GF254. Pada pengujian KLT, didapatkan noda tunggal pada setiap eluen dengan nilai faktor retensi (R_f) berturut-turut sebesar 0,733; 0,867; 0,6. Berdasarkan hasil R_f yang diperoleh, dikatakan cukup memenuhi syarat nilai R_f yang baik, yakni antara 0,2 - 0,8 yang merupakan parameter R_f analisis kuantitatif (Cai, 2014). Hasil pengujian KLT dapat dilihat pada Gambar 5.2.

Titik lebur senyawa murni ditentukan melalui pengamatan senyawa dari padatan menjadi cairan. Hasil uji rentang titik lebur senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea berturut-turut selama tiga kali percobaan sebesar, 0,9°C; 1,2°C; 1,1°C, dengan rata-rata sebesar 1,067°C. Rentang temperatur yang tidak begitu jauh menunjukkan kemurnian senyawa. Sampel dikatakan murni apabila memiliki rentang titik lebur 1 - 2 °C (Hart *et al.*, 2012).



6.1.3 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

Setelah uji kemurnian senyawa, dilanjutkan dengan uji konfirmasi struktur.

Pada penelitian ini dilakukan uji konfirmasi menggunakan spektrofotometri UV, spektrofotometri inframerah, spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan spektroskopi massa.

Uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mengetahui jenis kromofor, ikatan rangkap yang terkonjugasi dan auksokrom dari suatu senyawa organik, serta menjelaskan informasi struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa. Prinsip kerja dari spektrofotometri UV yaitu adanya interaksi antara energi yang berupa sinar monokromatis dengan materi yang berupa molekul, sehingga menyebabkan tereksitasinya elektron pada kulit terluar (Shah *et al.*, 2015). Hasil uji spektrofotometer UV *single beam* yang dapat dilihat pada Gambar 5.3, dengan THF sebagai pelaut, senyawa alilitiourea menunjukkan hasil satu *peak*, dengan panjang gelombang serta absorbansi alilitiourea sebesar 252 nm dan 1,889. Sedangkan senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea menunjukkan hasil 2 *peak*, dengan panjang gelombang dan absorbansi sebesar 247,0 nm; 278,0 nm dan 0,986; 0,936. Hal ini menunjukkan bahwa hasil spektrofotometer UV senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea telah sesuai jika dibandingkan dengan senyawa induk alilitiourea.

Uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri inframerah dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi dan jenis ikatan suatu senyawa organik, serta mengetahui informasi struktur suatu senyawa organik dengan membandingkan daerah sidik jaranya. Prinsip kerja spektroskopi IR adalah pengukuran jumlah radiasi IR, yang di



absorpsi dari suatu sampel (atau diemisikan) sebagai fungsi dari panjang gelombang (Pavia, 2009). Hasil uji spektrometri inframerah menunjukkan bahwa terdapat 6 gugus penting, yaitu gugus C=O ulur amida pada bilangan gelombang $1667,14 \text{ cm}^{-1}$; C=C aromatis pada bilangan gelombang $1547,57 - 1487,78 \text{ cm}^{-1}$; C=S pada bilangan gelombang $758,74 - 970,98 \text{ cm}^{-1}$; N-H ulur pada bilangan gelombang $3464,68 - 3221,66 \text{ cm}^{-1}$; C-N pada bilangan gelombang $1321,91 - 1011,39 \text{ cm}^{-1}$; C-Cl pada bilangan gelombang $720,16 - 608,30 \text{ cm}^{-1}$. Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa yang dihasilkan pada proses sintesis telah sesuai jika dilihat dari spektroskopi infra merah yang dihasilkan.

Uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dilakukan untuk mengetahui jumlah proton dan karbon yang memiliki lingkungan kimia (jenis, jumlah, serta letak atom) yang sama pada suatu senyawa organik, serta mengetahui informasi mengenai struktur suatu senyawa organik (Pavia, 2009). Prinsip kerja NMR didasarkan pada fakta bahwa inti atom memiliki sifat magnetik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu informasi kimia. Jika sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Hasil interpretasi spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dapat dilihat bahwa terdapat 7 jenis proton dan 9 jenis carbon dengan lingkungan kimia yang berbeda dalam senyawa produk sintesis. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan spektra NMR telah sesuai dengan hasil yang diprediksi, yakni senyawa 1-*alil*-3-(4-*klorobenzoil*) tiourea memiliki 7 jenis proton dan 9 jenis karbon dengan lingkungan kimia yang berbeda. Pada analisis tersebut ditemukan bahwa terdapat residual proton yang berasal dari kloroform-d



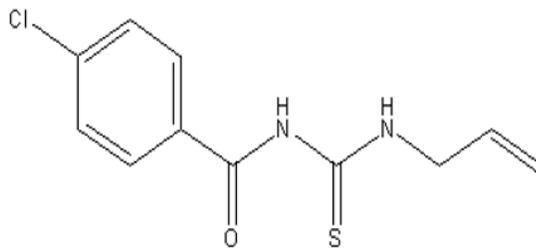
yang merupakan *solvent* pada uji NMR. Menurut Pavia (2009) *solvent* pada NMR memiliki proton residu yang dapat muncul dan terdeteksi sehingga dapat mengganggu observasi pada senyawa. Dapat dilihat bahwa hasil yang didapatkan telah sesuai dengan teori dimana terdeteksi Kloroform-d pada 7.25 ppm pada ^1H NMR dan 77, 41 -76,802 ppm pada ^{13}C NMR.

Uji konfirmasi struktur dengan spektroskopi massa yang dilakukan untuk mengetahui massa suatu molekul, menentukan rumus molekul dengan menggunakan Spektrum Massa Beresolusi Tinggi (*High Resolution Mass Spectra*), serta mengetahui informasi dari struktur dengan melihat pola fragmentasinya. Prinsip kerja dari spektroskopi massa adalah sampel akan diubah menjadi bentuk menjadi ion melalui proses ionisasi. Ion yang terbentuk akan disusun berdasarkan massanya (Pavia, 2009). Sistem ionisasi yang digunakan pada penelitian ini adalah *electrospray ionisation* (ESI). Pada penelitian ini bobot massa total senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea sebesar 254 m/z. Hasil uji spektroskopi massa menunjukkan bahwa terbentuk 4 serapan yang menunjukkan adanya 4 fragmen massa. Interpretasi spektra spektrofotometri massa dapat dilihat pada Tabel 5.7. Salah satu massa tertinggi ditemukan pada 278,1067 m/z yang memiliki perbedaan massa sebesar 23 m/z yang kemungkinan dimiliki oleh natrium. Pada proses ini dimungkinkan terjadi *ion adduct* yang umum terjadi pada MS, yaitu ion yang terbentuk oleh interaksi ion prekursor dengan satu atau lebih atom atau molekul untuk membentuk ion yang mengandung semua atom penyusun ion prekursor serta atom tambahan dari atom atau molekul terkait (Murray, 2013). Perkiraan ini juga didukung oleh data yang didapatkan pada pengujian MS dari senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea yang



menunjukkan bahwa terdapat penambahan natrium pada senyawa yang diuji sehingga massa awal senyawa sebesar 254,00 berubah menjadi 278,1067 m/z. Suatu penelitian oleh Lambert (2004), menunjukkan bahwa pada uji MS sangat dimungkinkan terdapat *ion adduct* yang berasal dari matix biologi ataupun perlengkapan gelas yang digunakan pada uji tersebut. Selain itu, hasil penelitian oleh Lambert tersebut juga menunjukkan bahwa kemungkinan terjadinya *ion adduct* oleh natrium juga dipengaruhi oleh kandungan natrium dalam sampel.

Berdasarkan uji konfirmasi struktur yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa BATU-4 adalah senyawa dengan nama IUPAC 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea, dengan rumus struktur dapat dilihat pada Gambar 6.2.



Gambar 6.2 Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

6.1.4 Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea

Tahap selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea secara *in vitro* pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi agar. Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri dilakukan identifikasi bakteri untuk memastikan bakteri yang digunakan sesuai, yaitu pewarnaan gram, uji koagulasi, dan uji katalase.

Hasil uji pewarnaan gram dengan mikroskop perbesaran 1000x, menunjukkan hasil bakteri gram positif berbentuk kokus dan berwarna ungu setelah proses



pewarnaan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.9. Bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan oleh kompleks zat warna kristal violet yang tetap dipertahankan meskipun setelah diberi larutan alkohol. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan yang tebal tanpa adanya lapisan lipoprotein atau polisakarida, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lapisan lipopolisakarida. Dikarenakan konsentrasi lipid dan ketebalan peptidoglikan pada bakteri sehingga bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna kristal violet sebagai zat pewarna primer (Thairu *et al.*, 2014).

Uji katalase menunjukkan hasil katalase positif terlihat dari terbentuknya gelembung gas (O_2) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.10. Uji katalase pada bakteri bertujuan untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana bakteri *Streptococcus* memberi respon negatif, sedangkan *Staphylococcus* memberikan respon positif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 . Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel (Harris *et al.*, 2002).

Hasil uji koagulase menunjukkan hasil koagulase positif terlihat dari adanya penggumpalan atau aglutinasi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.11. Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Reaksi koagulase positif berperan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lain. Koagulase merupakan salah satu protein yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat pada serum (Harris *et al.*, 2002).



Selanjutnya dilakukan uji antibakteri untuk mengetahui profil aktivitas antibakteri sampel uji. Metode yang digunakan yaitu dilusi agar dengan pelarut Tween 80 0,4% untuk mendapatkan Kadar Hambar Minimum (KHM). Metode dilusi agar merupakan metode yang melibatkan penggabungan berbagai konsentrasi yang diinginkan dari antimikroba ke dalam media agar (cair), umumnya menggunakan pengenceran dua-seri, yang diikuti dengan inokulasi inokulum mikroba pada permukaan plat agar. Metode dilusi adalah metode yang paling tepat untuk penentuan nilai KHM, karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media *broth* (makrodilusi atau mikrodilusi). Nilai KHM yang dicatat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$ atau mg/L (Balouiri *et al.*, 2016).

Dipilih Tween 80 sebagai *suspending agent* karena karakteristik senyawa uji turunan tiourea yang cenderung non polar dan sulit larut pada pelarut organik, sehingga diperlukan bantuan surfaktan dengan dibuat sediaan suspensi. Tween 80 (Polisorbat 80) merupakan surfaktan nonionik yang banyak digunakan sebagai pengemulsi maupun pelarut. Tween 80 digunakan sebagai *suspending agent* yang meningkatkan dispersi molekul dalam pelarut air, yang bekerja sebagai surfaktan dan meningkatkan kelarutan satu zat dalam zat lainnya (Prierti dan Lourdes, 2013). Hasil uji antibakteri dari senyawa uji dapat dilihat pada Tabel 5.8, dan kontrol positif, kontrol negatif serta kontrol agar dapat dilihat pada Tabel 5.9.

Hasil uji antibakteri sampel 1-*alil*-3-(4-klorobenzoil) tiourea pada 8 seri konsentrasi dari 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 ppm dengan 3 kali



replikasi menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berwarna kuning keemasan pada setiap *plate* sampel, hal ini menunjukkan tidak adanya efek antibakteri pada sampel uji, sehingga nilai KHM tidak dapat ditentukan. Hal ini diperkirakan karena kurangnya konsentrasi senyawa uji yang digunakan. Sebaiknya dibuat seri konsentrasi yang lebih besar dari 1000 ppm agar dapat mengevaluasi lebih lanjut efek antibakteri pada sampel uji. Namun, dikarekan kelarutan sampel uji yang kurang baik pada Tween 0,4% sehingga tidak dapat menghasilkan larutan sampel dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 1000 ppm.

Hasil uji antibakteri kontrol positif gentamisin pada 5 seri konsentrasi dari 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 ppm dengan 3 kali replikasi menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada setiap *plate* sampel, hal ini menunjukkan adanya efek antibakteri pada kontrol positif gentamisin, namun nilai KHM tetap tidak dapat ditentukan. Sebaiknya dilakukan uji kembali dengan membuat seri konsentrasi larutan gentamisin hingga konsentrasinya <1 ppm agar nilai KHM dapat diamati, karena menurut USP (2013) nilai KHM gentamisin berkisar 0,12 – 1 mcg/mL (ppm). Nilai KHM dilihat dari konsentrasi minimum atau terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Balouri *et al.*, 2016).

Hasil uji antibakteri kontrol negatif Tween 80 0,4% menunjukkan tidak adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada setiap *plate* sampel, hal ini menunjukkan bahwa pelarut tidak memiliki efek antibakteri. Kontrol agar juga menunjukkan hasil yang sama, tidak adanya hambatan pertumbuhan bakteri.

Menurut Wisnu, *et al.* (2018), yang melakukan penelitian terkait aktivitas antibakteri senyawa turunan tiourea, didapatkan pula hasil yang serupa yakni senyawa



sintesis N-fenil-4-klorobenzamida tidak menunjukkan adanya aktivitas hambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, namun menunjukkan aktivitas hambatan pada konsentrasi 8000 dan 10000 µg/ml pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal tersebut dimungkinkan disebabkan oleh struktur dinding bakteri gram negatif yang terdiri lipopolisakarida yang tebal dibanding bakteri gram positif.

Aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh pertimbangan status bakteri, ukuran inokulum, serta konsentrasi agen antibakteri,. Suatu antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi bila KHM terjadi pada kadar antibakteri yang rendah, dan memiliki daya bunuh atau daya hambat yang besar. Jika antibakteri pada kadar yang rendah dapat memberikan hambatan yang besar, antibakteri tersebut berpotensi tinggi terhadap mikroba uji yang digunakan (Li *et al*, 2017).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri (Li *et al*, 2017):

1. Status bakteri : Status bakteri adalah salah satu penentu aktivitas antimikroba. Fenotip bakteri berbeda di bawah paparan antibiotik, seperti kerentanan, resistensi, toleransi, dan persistensi
2. Ukuran inokulum bakteri : Efek inokulum didefinisikan sebagai meningkatnya KHM dengan peningkatan jumlah inokulum bakteri. Bakteri tampak rentan ketika inokulum standar (10^5 CFU/mL), tetapi akan menjadi resisten jika jumlah inokulum meningkat. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa inokula bakteri yang tinggi di lokasi infeksi dapat menurunkan aktivitas agen antibakteri. Mekanisme yang mendasari efek inokulum yakni dapat mengurangi rasio molekul agen antibakteri yang tersedia per target karena



berkurangnya konsentrasi agen antibakteri yang efektif. Ukuran inokulum juga penting dalam munculnya resistensi antibakteri.

3. Konsentrasi agen antibakteri : Setiap agen antibakteri memiliki mekanisme yang berbeda. Konsentrasi antibiotik yang berbeda dapat menghasilkan seleksi bakteri resisten yang berbeda, sehingga mempengaruhi kekuatan antimikroba.

Selain itu, faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil pengujian antimikroba mencakup seluruh prosedur pengambilan sampel, pengujian, dan pelaporan. Setiap penyimpangan dari prosedur standar dapat secara signifikan berdampak hasil uji.

Sistem pendukung alur kerja laboratorium memerlukan pemantauan ketat, dan personel laboratorium harus terlatih dengan baik dan cukup kompeten untuk melakukan prosedur. Salah satu contoh lain yakni kualitas spesimen yang buruk dapat menyebabkan hasil yang menyimpang. Inokulasi yang dilakukan dengan benar pada suatu media menggunakan koloni yang tercampur akan menghasilkan hasil yang tidak sesuai. Standarisasi suspensi bakteri yang buruk dan kedalaman agar dalam plate dapat menghasilkan hasil akhir yang tidak sebagaimana mestinya. Pengawasan suportif untuk staf laboratorium diperlukan, untuk mencegah penyimpangan, pemborosan waktu dan sumber daya (Bayot dan Bradley, 2020).

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Penelitian ini dapat menjadi acuan dasar rekomendasi dan potensi bagi penelitian selanjutnya mengenai sintesis senyawa turunan benzoiltiourea sebagai antibakteri.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik dengan metode *Schotten-baumann*

7.1.2 Senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea tidak memiliki aktifitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan antibiotik gentamisin.

7.2 Saran

7.2.1 Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut terkait uji in siliko senyawa 1-alil-3-(4-klorobenzoil) tiourea untuk mengetahui aktivitas biologisnya

7.2.2 Diberi perhatian khusus pada proses rekristalisasi senyawa agar dapat mendapatkan jumlah kristal yang lebih optimal.



DAFTAR PUSTAKA

- Arslan, Hakan, Nizami Duran, Gulay Borekci, Cemal Koray Ozer dan Cevdet Akbay. 2009. Antimicrobial Activity of Some Thiourea Derivatives and Their Nickel and Copper Complexes. *Molecules* 2009, 14, 519-527.
- Balouiri, M. 2016. Methods for in-Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Elsevier : Journal of Pharmaceutical Analysis* (6): 71–79.
- Bamane, Rohan V., Vijay K. Rakholiya, Trupti S. Chitre. 2011. Application Of Schotten-Baumann Reaction: Synthesis Of Some Tetrahydroquinoline-3-Carbohydrazide Derivatives. *Journal Oalib Vol. 1: (3), 2011, 263-268.*
- Bielenica, Anna, Joanna, S., Karolina, S., Agnieszka, N., Ewa, A.K., Giuseppina, S., Silvia, M., Stefano, B., Gabriele, G., Malgorzata, W. dan Marta, S. 2015. Synthesis, Cytotoxicity And Antimicrobial Of Thiourea Derivatives Incorporating 3-(Trifluoromethyl)Phenyl Moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1 – 30.
- Bien, Justyna, Olga Sokolova, dan Przemyslaw Bozko. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* : Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens Volume 2011, 13.*
- Brunton, L. 2014. *Goodman and Gilman : The Pharmaceutical Basis of Theurapeutic 12th Edition.* US : McGraw Hill.
- Budiati, Tutuk, Suzana dan Siti Surdijati. 2010. Sintesis, Uji Aktivitas Analgesik Dan Antinflamasi Senyawa Benzothiourea Tersubstitusi. *Majalah Farmasi Indonesia, 21(1), 2010.*
- Bunaciu, Andrei A. 2011. Recent Applications of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Herbal Medicine Analysis. *Applied Spectroscopy Reviews, 46:251–260, 2011.*
- Bayot, Marlon L. dan Bradley N. Bragg. 2020. Antimicrobial Susceptibility Testing. Florida : StatPearls Publishing. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/> Diakses 6 Juli 2020 (02.00))
- Cai, Li. 2014. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* USA : John Wiley & Sons.
- CLSI. 2010. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guideline, 2nd. ed. CLSI document M45-A2.* USA : Clinical and Laboratory Standards Institute..



- CLSI. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11*. USA : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dipiro Joseph T., Terry L. Schwinghammer, dan Cecily V. Dipiro. 2015. *Pharmacotherapy Handbook 9th Edition*. US : McGraw Hill.
- Dugassa, Jiregna dan Shukuri, N. 2017. Review on Antibiotic Resistance and Its Mechanism of Development. *Journal of Health, Medicine and Nursing*. Vol 1(3) : 1-17.
- Etebu, Ebimiewei dan Ibemologi Arikekpar.2016. Antibiotics: Classification and Mechanisms of Action with Emphasis on Molecular Perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research* 4 (2016) 90-101.
- Gandhimathi, R., S. Vijayaraj, dan M.P. Jyothirmaie. 2012. Analytical Process of Drugs by Ultraviolet (UV) Spectroscopy - A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*. 2 (2): 72-78.
- Glory, M, Kiranmai M., Karunakar G. V., Narendra Sharat Chandra. 2016. Synthesis, Antimicrobial Activity and Docking Studies of Novel Urea and Thiourea Derivatives. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, Vol. 11, Issue 6 Ver. III, PP 10-16.
- Gnanamani, Arumugam, Periasamy Hariharan dan Maneesh Paul Satyaseela. 2017. *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Frontiers in Staphylococcus aureus, Intech Open*.
- Halim, Ainaa Nadiah Abd, Zainab Ngaini. 2016. Synthesis and Bacteriostatic Activities of Bis(thiourea) Derivatives with Variable Chain Length. *Journal of Chemistry, Volume 2016 Article ID 2739832, 7*.
- Harris, L.G. et al. 2002. An Introduction To Staphylococcus Aureus, And Techniques For Identifying And Quantifying S. aureus Adhesins In Relation To Adhesion To Biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, Vol. 4, 39-60.
- Jawetz, M., Melick, J.L., dan Adelberg, E.A. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : EGC.
- Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Disease*, 49 : 1749-55.



Kamalulazmy, Nurulain, Sahilah Abd Mutalib, Fatin Ilyani Nasir, dan Nurul Izzaty Hassan. 2016. Characterization And Antimicrobial Studies Of Five Substituted Bis-Thioureas. *Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol 20 No 1 (2016): 85 – 90.*

Katzung, B. G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology, 10th edition.* US : Lange Medical Publications.

Katzung, Bertram G. (2010). *Farmakologi Dasar dan Klinik Edisi 10.* Jakarta : Buku Kedokteran EGC.

Kakkar M, Chatterjee P, Chauhan AS, Grace D, Lindahl J, Beeche A *et al.* Antimicrobial Resistance In South East Asia: Time To Ask The Right Questions. *Glob Health Action.* 2018;11(1).

Klein, David 2012. *Organic Chemistry.* USA : John Wiley & Sons.

Krause, Kevin M., Alisa W. Serio, Timothy R. Kane, and Lynn E. Connolly. 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Medicine.*

Kumar, Subash Vijaya, G. Damodar, S. Ravikanth, dan G. Vijayakumar. 2012. An Overview On Infectious Disease. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research, Vol 2 (2) : 63-74*

Kumar, Sanjeet, K. Jyotirmayee, Monalisa Sarangi. 2013. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 18(1), 126-132.*

Li, Jun *et al.* 2017. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 364.

Magaldi, S., S. Mata-Essayag, C.Hartung de Capriles, *et al.* Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int. J. Infect. Dis.* 8: 39–45.

Myles, Ian dan Sandip K. Datta. 2012. *Staphylococcus aureus: an Introduction.* *Semin Immunopathol.* 34(2): 181-184.

Name Reaction. 2020. *Schotten-Baumann Reaction.* (<https://www.name-reaction.com/schotten-baumann-reaction> diakses pada 3 Januari 2020).

Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., dan Vyvyan J.R. 2009. *Introduction to Spectroscopy; Fourth Edition.* USA : Belmont.

Prieto, Cristina dan Lourdes Calvo. 2013. Performance of the Biocompatible Surfactant Tween 80, for the Formation of Microemulsions Suitable for New Pharmaceutical Processing. *Journal of Applied Chemistry, Vol. 2013, 10 pages.*



Raja, Pavan M. V. dan Andrew R. Barron. 2020. *Melting Point Analysis*. (https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/ diakses pada 22 Februari 2020).

Riset Kesehatan Dasar. 2018. Hasil Utama Riskesdas 2018. Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. (<http://www.depkes.go.id/resources>, Diakses pada 16 September 2019).

Shah, R.S., Rutuja R. Shah, Rajashri B. Pawar, Pranit P. Gayakar. 2015. UV-Visible Spectroscopy – A Review. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*. 5 (5): 490-505.

Shakeel, Azeem., Ataf, A.A., Ashfaq, M.Q., dan Amin, B. 2016. Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry : A Short Review. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*. 2(1) : 10-20.

Shalas, Alvan F., Siswandono, dan Marcellino Rudyanto. 2018. Synthesis and Pain Inhibition Activity of the Analogs of 1-Allyl-3-Benzoylthiourea for New Analgesic Lead Compound Discovery. *J Young Pharm*, 2018; 10(1): 12-15.

Silverstein, R.M., G.B. Bassler., and T.C.D. Morcill. 1986. *Penyelidikan Spektrometri Senyawa Organik*. Jakarta : Erlangga.

Siswandono, 2014. *Pengembangan Obat Baru, Edisi Pertama*, Surabaya: Airlangga University Press.

Solomons, T.W., Graham, Craig B. Fryhle, Scott A. Snyder. 2014. *Organic Chemistry*. USA : John Wiley & Sons.

Thairu, Yunusa *et al*. 2014. Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, Vol. 1, Issue 4.

The Food And Drug Administration. 2013. Gentamicin Injection. (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/ diakses pada 15 Januari 2020)

Tong, Steven Y. C., Joshua S. Davis, Emily Eichenberger, Thomas L. Holland, Vance G. Fowler, dan Jr. 2015. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Journal American Society for Microbiology*, Vol. 28 (3) : 603 – 661.

Valgas, C., S. M. De Souza, E.F.A. Smania, *et al*. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.* 38: 369–380.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Jumlah Bahan untuk Sintesis

Aliltiorea : 4-klorobenzoilklorida : Trietilamin = 1,2 : 1 : 2

Bahan	Mr (g/mol)	Densitas (g/mL)	Jumlah mol
Aliltiorea	116,18	1,110	0,024
4-klorobenzoilklorida	175,01	1,365	0,020
Trietilamin	101,19	0,726	0,040

Dari hasil diatas, dilakukan pengambilan bahan sebanyak :

1. Massa Aliltiorea = mol x Mr = 0,024 mol x 116,18 g/mol = 2,788 g
2. Massa 4-klorobenzoil klorida = mol x Mr = 0,020 mol x 175,01 g/mol = 3,500 g
→ Volume 4-klorobenzoil klorida = massa : densitas = 3,500 g : 1,365 g/mol = 2,564 mL
3. Massa Trietilamin = mol x Mr = 0,040 x 101,19 = 4,0476 g
→ Volume Trietilamin = massa : densitas = 4,0476 g : 0,726 g/ml = 5,575 mL

Lampiran 2. Perhitungan Hasil Sintesis

Berat teoritis produk BATU-4 = mol x Mr = 0,02 mol x 254,74 = 5,0948 g

Berat nyata produk (serbuk) = 1,6376 g

Berat nyata produk (dalam 300 mg serbuk) (kristal) = 0,1058 g

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat nyata}}{\text{Berat teoritis}} \times 100\% = 11,336 \%$$



Lampiran 3. Surat Bukti Kelayakan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 48 / EC / KEPK / 02 / 2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Sintesis, Uji Aktivitas Antibakteri, dan Docking Molecular Senyawa Turunan 1-Alil-3-Benzoiitiourea.

PENELITI UTAMA : Alvan Febrian Shalas, M.Farm.,Apt

ANGGOTA :

- 1. Prof. Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si.,Apt
2. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S.Farm, M.Farm.,Apt
3. Kadek Devi Arum Savitri
4. Nada Arum Wardhani
5. Nurilita Dwi Rahmanigtia
6. Imroatul Hasanah
7. Muhammad Fahmi H.
8. I'id Wahidatul K.
9. Rory Anggi Okta S.
10. Fiina Prasetya L.
11. Fadilah Maulana I.A
12. Natalie Dhera D.K
13. Veren Kurnia Putri
14. Azatil Ismah Firdaus
15. Jauharoh Nabilah
16. Rachmad Rizky D.
17. Era Wiloka
18. Kevin Nauval Karim
19. Hanif Syafa'atur R.

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua,



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, Sp.S, Sp.BS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy.
Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)



Lampiran 4. Perhitungan Dosis Uji Antibakteri

1. Sampel Uji BATU-4

1.1 Membuat larutan induk

Akan dibuat konsentrasi : 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 ppm
(dalam agar dengan ratio larutan uji : agar (4:6))

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\rightarrow 4 \text{ mL} \times M_1 = 1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \rightarrow M_1 = 2.500 \text{ ppm}$$

Dibuat larutan induk 2.500 ppm \rightarrow Ditimbang 62,5 mg ad 25 mL labu ukur

1.2 Membuat seri pengenceran konsentrasi

Melakukan pengenceran $\frac{1}{2}$ kali dari larutan induk hingga seterusnya menjadi 7,8125 ppm

2. Kontrol Positif Gentamisin

2.1 Membuat larutan induk

Akan dibuat konsentrasi : 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 ppm (dalam agar dengan ratio larutan uji : agar (4:6))

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\rightarrow 4 \text{ mL} \times M_1 = 125 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \rightarrow M_1 = 312,5 \text{ ppm}$$

Gentamisin Injeksi (40 mg/mL (ppm)) : $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

$$\rightarrow 312,5 \text{ mL} \times 25 = V_2 \times 40.000 \text{ ppm} \rightarrow V_2 = 0,1953 \text{ mL}$$

2.2 Membuat seri pengenceran konsentrasi

Melakukan pengenceran $\frac{1}{2}$ kali dari larutan induk hingga seterusnya menjadi 7,8125 ppm

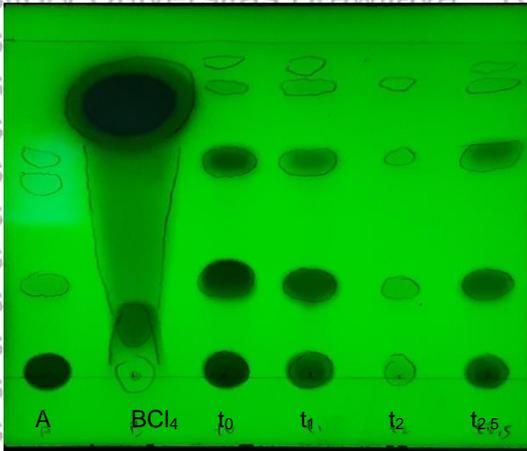
3. Kontrol Negatif Tween 80 0,4%

Ditimbang 4 gram tween ad 1 L aquadest dalam labu ukur

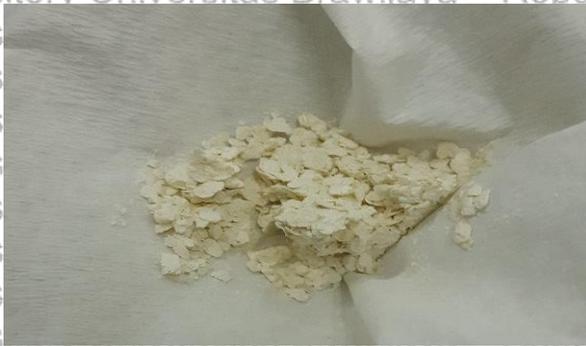


Lampiran 5. Dokumentasi Proses Sintesis dan KLT

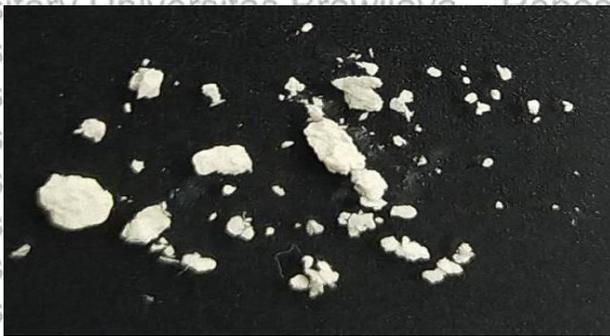
1. KLT Proses Sintesis Senyawa (n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1))



2. Hasil Serbuk



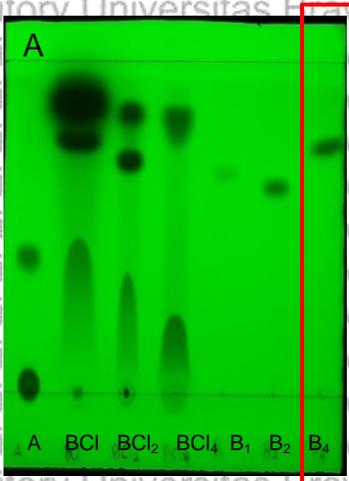
3. Hasil Kristal



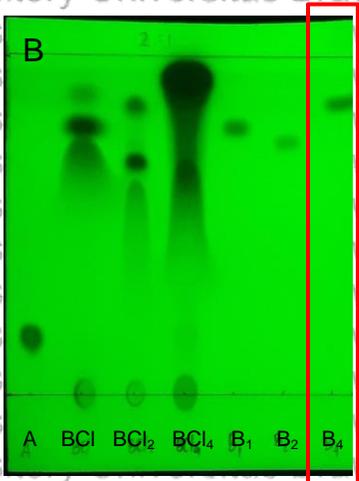


Lampiran 6. Dokumentasi Uji Kemurnian KLT

1. n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1)

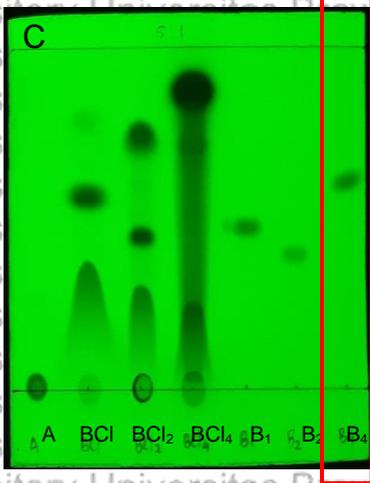


2. n-heksana : tetrahidrofuran (2:1)





3. n-heksana : etil asetat (5:1)



Lampiran 7. Dokumentasi Uji Kemurnian Rentang Titik Lebur

1. Percobaan ke-1



2. Percobaan ke-2



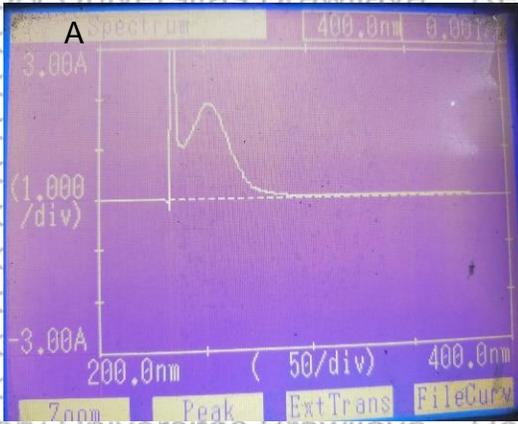
3. Percobaan ke-3





Lampiran 8. Spektra UV

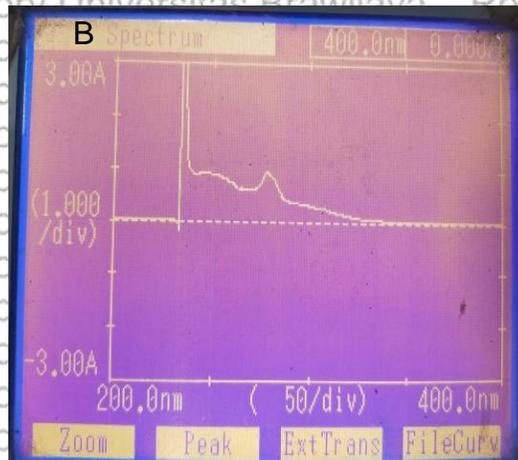
1. Spektra Alitiourea



Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
252.0	1.889		

Graph

2. Spektra BATU-4



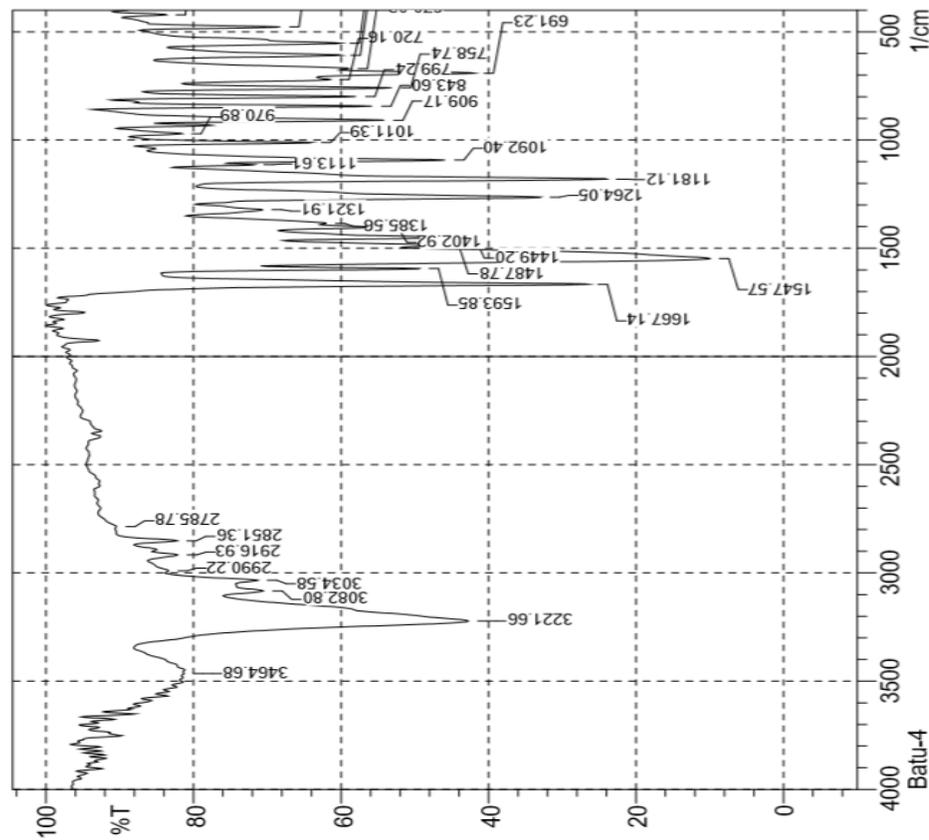
Abscis.	ABS	Abscis.	ABS
278.0	0.938		
247.0	0.906		

Graph

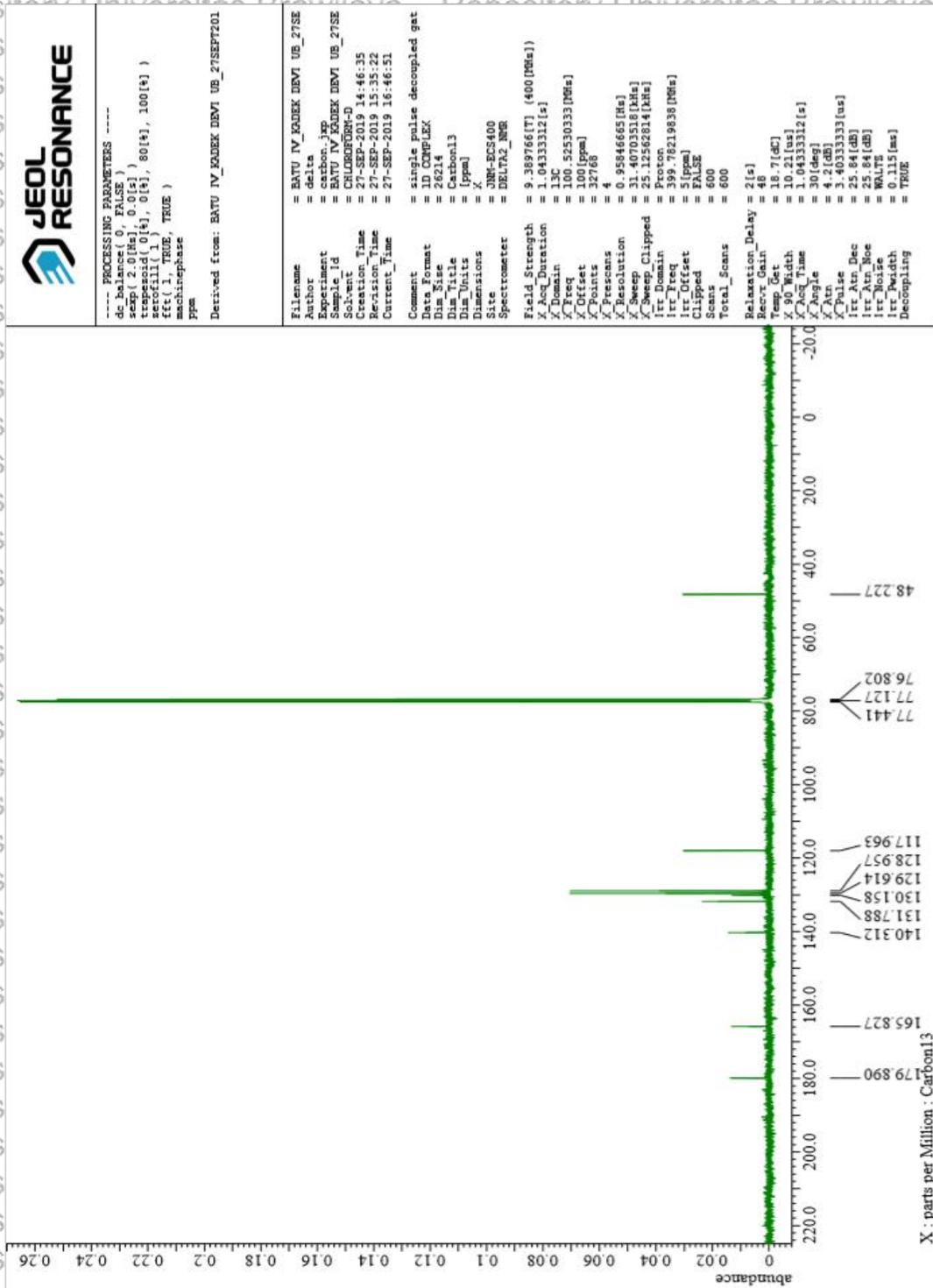


Lampiran 9. Spektra IR

Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	83.671	6.587	432.79	407.71	1.518	0.407
2	477.15	68.229	492.58	461.72	3.294	1.384
3	552.37	60.069	571.65	494.51	9.333	4.032
4	608.3	59.956	24.623	573.58	7.338	3.194
5	670.02	58.963	3.232	673.87	631.44	0.256
6	691.23	41.897	19.67	708.59	676.8	2.312
7	720.16	61.462	7.889	739.45	710.52	0.668
8	758.74	53.108	31.023	776.09	741.38	2.843
9	799.24	57.972	31.051	812.74	778.02	4.438
10	843.6	55.781	34.825	857.1	828.17	3.943
11	909.17	54.165	31.884	920.74	859.03	6.884
12	970.89	81.538	7.702	984.39	947.75	2.456
13	1011.39	63.928	24.231	1026.82	986.32	4.325
14	1092.4	45.881	32.082	1105.9	1049.97	9.13
15	1113.61	71.753	6.15	1125.18	1107.83	2.149
16	1181.12	23.962	56.898	1213.9	1127.11	20.378
17	1264.05	32.91	46.784	1296.84	1215.83	18.205
18	1321.91	70.656	9.46	1348.91	1298.77	6.336
19	1385.56	62.063	2.566	1389.41	1350.84	5.975
20	1402.92	54.898	10.375	1418.34	1391.34	5.876
21	1449.2	44.435	23.63	1464.63	1420.27	10.576
22	1487.78	46.587	9.254	1495.49	1466.56	7.638
23	1547.57	10	53.085	1582.28	1497.42	50.02
24	1593.85	49.36	25.135	1615.07	1584.21	5.775
25	1667.14	26.455	63.419	1726.93	1626.64	16.482
26	1765.78	90.462	0.477	1795.42	2724.06	2.667
27	2851.36	82.188	6.635	2868.71	2816.64	3.165
28	2916.93	82.156	3.677	2943.93	2901.5	3.173
29	2990.22	83.384	0.878	2999.86	2945.86	3.887
30	3034.58	71.26	6.046	3050.01	3001.79	5.537
31	3082.8	70.554	4.376	3104.01	3065.44	5.335
32	3221.66	42.742	39.083	3345.1	3105.94	45.025
33	3464.68	81.27	0.233	3474.32	3466.96	1.552
						0.011



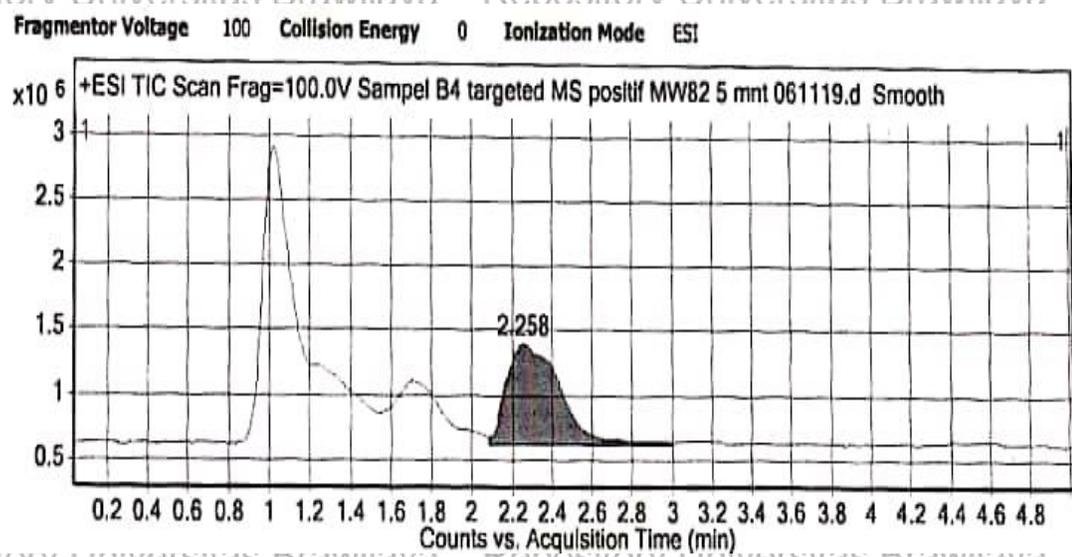
Lampiran 11: Spektra ¹³C-NMR



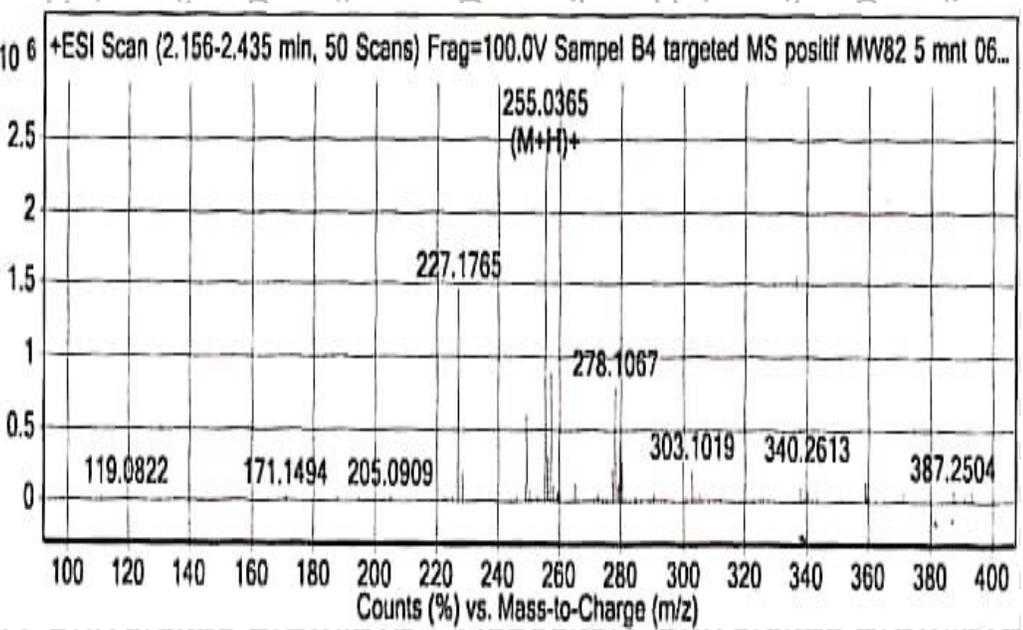


Lampiran 12. Spektra LC-MS

a) Kromatograf



b) Spektra Massa

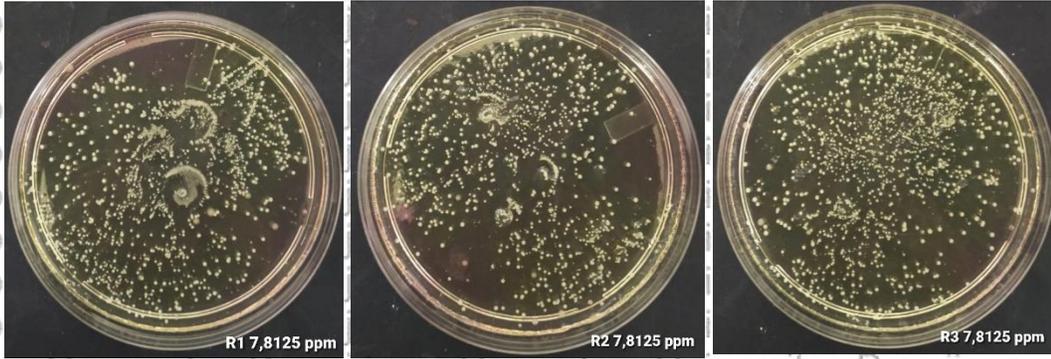




Lampiran 13. Dilusi Agar

1. Larutan Uji BATU-4

1.1 Konsentrasi 7,8125 ppm



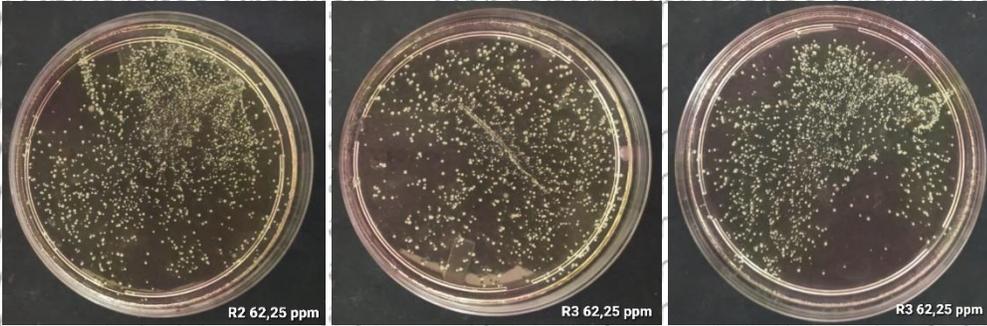
1.2 Konsentrasi 15,625 ppm



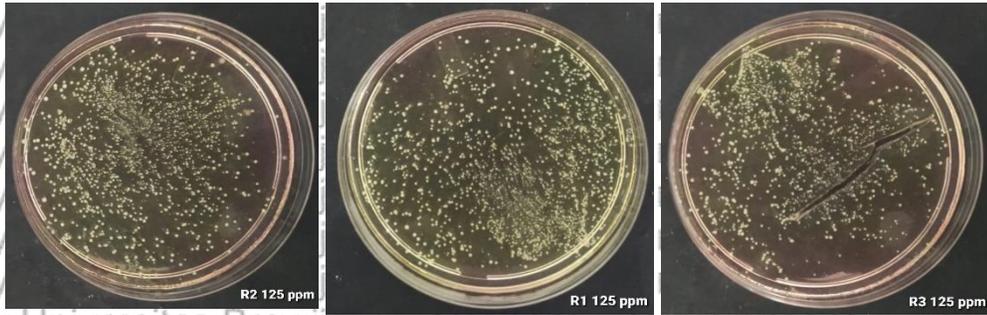
1.3 Konsentrasi 31,25 ppm



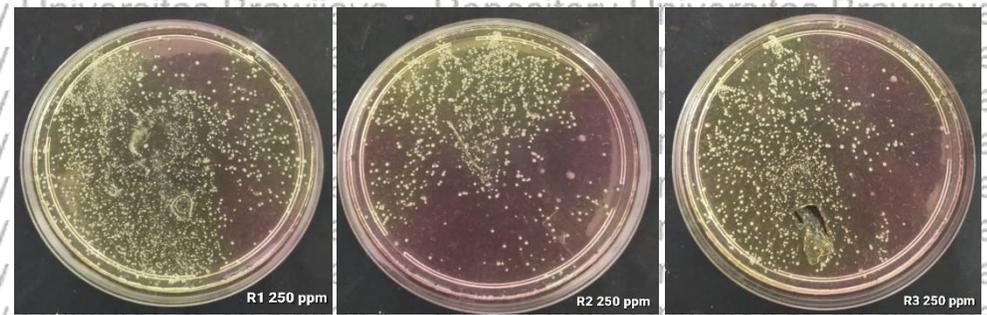
1.4 Konsentrasi 62,5 ppm



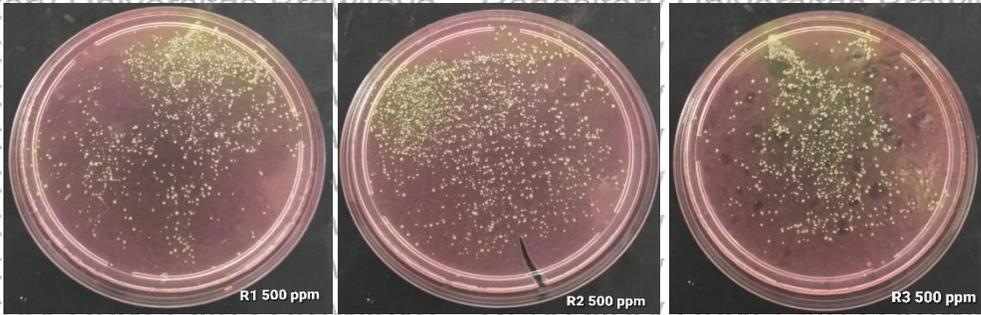
1.5 Konsentrasi 125 ppm



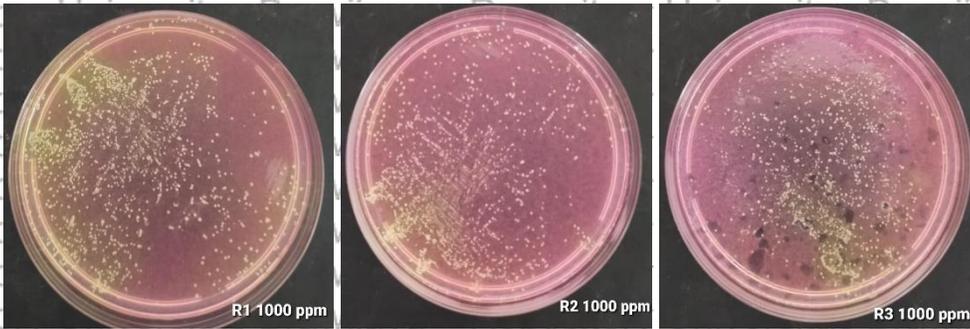
1.6 Konsentrasi 250 ppm



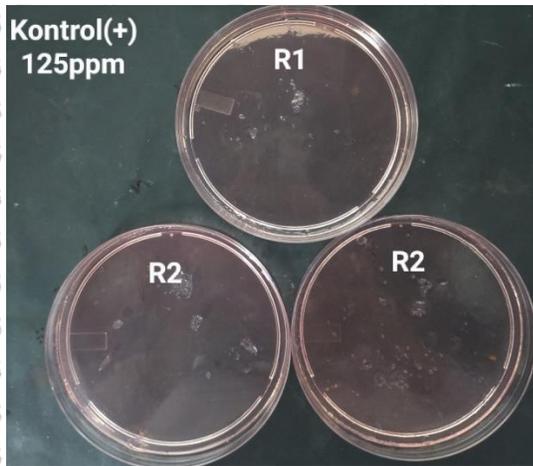
1.7 Konsentrasi 500 ppm



1.8 Konsentrasi 1000 ppm

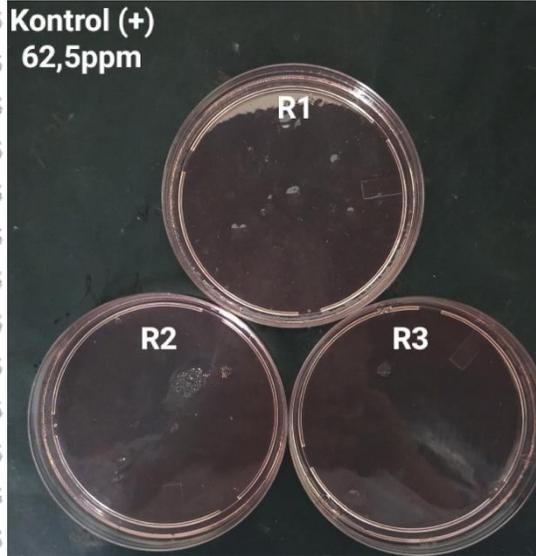


2. Kontrol Positif

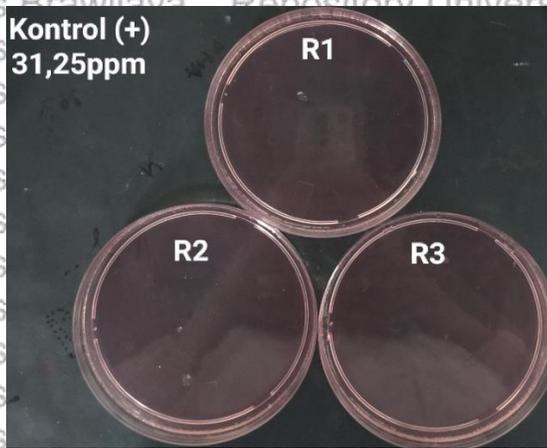




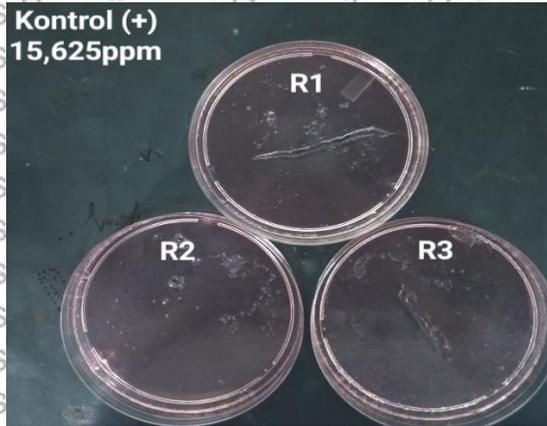
Kontrol (+)
62,5ppm



Kontrol (+)
31,25ppm

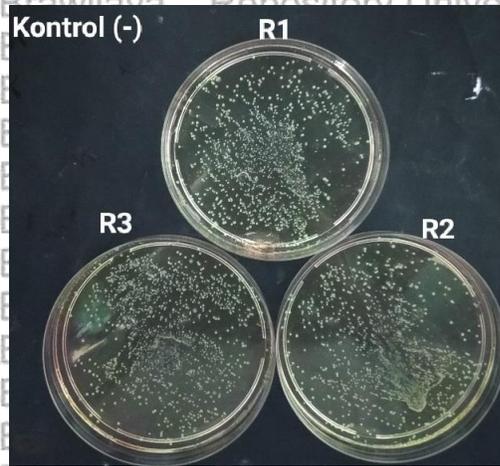
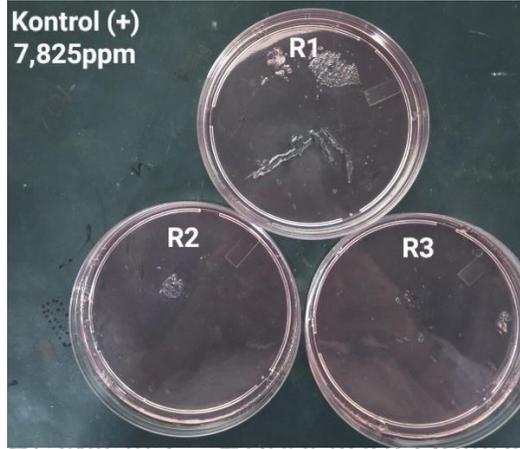


Kontrol (+)
15,625ppm



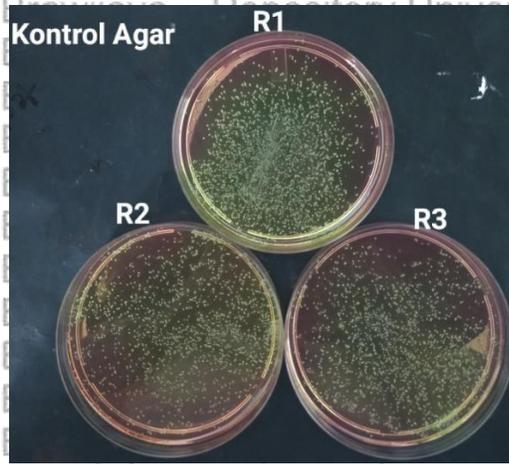


3. Kontrol Negatif





4. Kontrol Agar





Lampiran 14. Surat Keterangan Strain Kuman



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

DIREKTORAT JENDERAL PELAYANAN KESEHATAN

BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA

Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya 60286

Telepon Pelayanan : (031) 5020306; TU : (031) 5021451; Faksimili : (031) 5020388

Website : bblksurabaya.id; Surat Elektronik : bblksub@yahoo.co.id



Surabaya, 23 Januari 2020

Berikut ini lampiran surat keterangan strain kuman yang dibeli oleh :

- Nama : Kadek Devi Arum
- Institusi : Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya
- Tanggal permintaan : 10 Januari 2020
- Keperluan : Penelitian
- Keterangan dan Hasil Uji Biokimia bakteri :
- Bakteri : *Staphylococcus aureus*
- ATCC : ATCC 25923
- Passage : #3

Hasil Uji Biokimia bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 :

No	Jenis Uji	Hasil
1	Pengecatan Gram	Gram positif coccus bergerombol
2	Glukose	Positif (+)
3	Sukrose	Positif (+)
4	Manitol	Positif (+)
5	Katalase	Positif (+)
6	Koagulase	Positif (+)
7	DNase	Positif (+)
8	Haemolisa	β Haemolitik

Manajer Teknis

dr. Titiek S, M.Ked Klin, Sp.MK
NIP. 198207262010122002

