

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama bulan Februari hingga Agustus 2017 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia FMIPA dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya

3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah minyak jeruk purut Institut Atsiri (kadar sitronelal sebesar 69.88%, berat jenis 0,8 g/mL), etanol 96%, metilamin, anilin, o-toluidine, p-nitroanilin dan akuades. Untuk uji aktivitas antibakteri, digunakan bahan *nutrient agar*, *nutrient broth*, kultur *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah gelas kimia 250 mL, gelas arloji, corong gelas, pipet ukur, bola hisap, labu alas bulat, labu alas datar, gelas ukur, kondensor bola, sonikasi 2210 Brenson, microwave, corong pisah, neraca analitik *Ohaus Precision Advanced*. Pada karakterisasi produk digunakan instrumen kromatografi gas-spektrometer massa (GCMS-QP 2010S Shimadzu), Spektrofotometer UV-vis Shimadzu 1601 dan FT-IR (FT-IR 8400S Shimadzu). Pada uji aktivitas antibakteri digunakan alat cawan petri, mikroskop elektron, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, botol kultur, tip, eppendorf, autoklaf, mikropipet, erlenmeyer, cork bor 4' dan pinset.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Analisis komposisi senyawa penyusun dalam minyak jeruk purut
2. Sintesis senyawa *Schiff base* menggunakan microwave dan ultrasonik.

3. Analisis senyawa *Schiff base* FT-IR 8400S Shimadzu, UV-vis Shimadzu 1601 dan GCMS-QP 2010S Shimadzu.
4. Peremajaan dan penginokulasian bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
5. Penentuan aktivitas antibakteri senyawa *Schiff base* hasil dari sintesis sitronelal dengan amina.
6. Analisis data.

1.5 Prosedur Kerja

1.5.1 Analisis Komposisi Senyawa Penyusun dalam MJP

Analisis komposisi senyawa penyusun MJP dilakukan dengan menginjeksikan sampel 0,2 μL menggunakan *syringe* pada instrument KG-SM Shimadzu QP2010. Masing-masing puncak yang terdeteksi pada kromatogram akan dianalisis menggunakan spektra massa. Sehingga hasil akhir analisis diperoleh *total ionic chromatogram* dan spektra massa dari masing-masing kompon. Adapun kondisi instrumen KG-SM yang digunakan sebagai berikut :

| | |
|----------------------------|-----------------|
| Gas pembawa | : He |
| Temperatur kolom | : 40 °C |
| <i>Temperatur Injector</i> | : 310 °C |
| Kecepatan aliran gas | : 94,8 mL/menit |
| Tekanan | : 20,8 kPa |

3.5.2 Sintesis Senyawa Schiff Base Antara Sitronelal Dengan Senyawa Amina Menggunakan Microwave LG.

Sintesis senyawa Schiff base didapatkan dari hasil reaksi sitronelal dalam MJP dengan senyawa amina menggunakan perbandingan mol 1:1. Minyak jeruk purut diambil sebanyak 19,6 mL (70 mmol) dan dimasukkan ke dalam labu alas datar. Kemudian ditambahkan sedikit H_2SO_4 tetes demi tetes. Selanjutnya ditambahkan senyawa amina (2,3 mL metilamin/1,8 mL anilin/6,4 mL o-toluidine/ 9,66 gram p-nitroanilin). Labu alas datar dimasukkan ke dalam microwave dan diatur waktu reaksi 1, 2 dan 3 jam. Dua lapisan yang terbentuk dipisahkan menggunakan corong

pisah. Lapisan bawah yang diperoleh ditampung ke dalam botol vial dan ditimbang untuk mengetahui massa hasil reaksi.

3.5.3 Sintesis Senyawa Schiff Base Antara Sitronelal Dengan Senyawa Amina Menggunakan Ultrasonik 2210 Brenson.

Sintesis senyawa Schiff base didapatkan dari hasil reaksi sitronelal dalam MJP dengan senyawa amina menggunakan perbandingan mol 1:1. Minyak jeruk purut diambil sebanyak 19,6 mL dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Kemudian ditambahkan sedikit H_2SO_4 tetes demi tetes. Selanjutnya ditambahkan senyawa amina (2,3 mL metilamin/1,8 mL anilin/6,4 mL o-toluidine/ 9,66 gram p-nitroanilin). Labu alas bulat dimasukkan ke dalam ultrasonik dan diatur waktu reaksi 1, 2 dan 3 jam. Dua lapisan yang terbentuk dipisahkan menggunakan corong pisah. Lapisan bawah yang diperoleh ditampung ke dalam botol vial dan ditimbang untuk mengetahui massa hasil reaksi.

3.5.4 Analisis Produk Schiff Base

A. Analisis Menggunakan FTIR

Masing-masing sampel senyawa *Schiff base* serta sampel minyak jeruk purut diambil 1 mL diuji menggunakan FTIR Shimadzu 8400 S dengan metode NaCl *window* untuk sampel cair. Analisis dilakukan pada jarak bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

B. Analisis Menggunakan UV-vis

Masing-masing sampel senyawa *Schiff base* serta sampel minyak jeruk purut diambil 1 tetes dan dilarutkan dalam pelarut etanol 96% diuji menggunakan UV-vis Shimadzu 1601.

3.5.5 Penentuan Aktivitas Antibakteri

A. Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri

Sebanyak satu ose koloni bakteri *E. coli* dan *S. aureus* diinokulasikan dalam 10 mL *Nutrient broth* kemudian dinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Densitas optik kultur tersebut diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm (OD_{625}). OD_{625} yang dihasilkan dikonversi menjadi 0,1. OD_{625} 0,1

senilai dengan standar 0,5McFarland (kepadatan sel bakteri 10^8 sel/mL). Suspensi bakteri kemudian diencerkan menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan sel 10^8 sel/mL dengan mengambil 1,2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 8,8 mL *Nutrient broth*. Kemudian divortex dan dihasilkan suspensi bakteri dengan kepadatan sel 10^8 sel/mL.

B. Penentuan Zona Hambat Dengan Metode Cakram

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi sumuran. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan masing-masing sampel senyawa *Schiff Base*, sebagai pembanding etanol 96% sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan 4 jenis senyawa *Schiff Base* dari hasil sintesis sitronelal dengan amina dan waktu inkubasi selama 24 jam.

Sebanyak 2 cawan petri yang sudah steril disiapkan. Suspensi bakteri dioleskan ke cawan petri secara aseptis kemudian diletakkan 7 cakram. Empat cakram diisi dengan sampel senyawa *Schiff Base* yang berbeda, 1 minyak jeruk purut, 1 kontrol positif (+) dan 1 kontrol negatif (-), kemudian diinkubasi pada temperatur $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk diukur dan diketahui sebagai luas zona hambat.

3.6 Analisis Data

3.6.1 Analisis Menggunakan KG-SM

Data *total ionic chromatogram* (TIC) yang diperoleh dari kromatogram KG-SM hasil analisis minyak jeruk purut digunakan sebagai dasar menentukan persen (%) relatif sitronelal dalam minyak jeruk purut.

Berdasarkan hasil analisis senyawa *Schiff base* dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa TIC dan spektra masing-masing komponen. TIC menggambarkan banyaknya senyawa berdasarkan persen area yang dihasilkan sedangkan spektra massa

menggambarkan m/z masing-masing senyawa yang terdeteksi pada kromatogram.

3.6.2 Persentase (%) Yield

Massa sampel dari masing-masing senyawa *Schiff base* yang didapatkan digunakan untuk menentukan persen (%) yield dengan cara perbandingan antara massa sampel hasil penelitian dengan masa teoritis dikali 100% dengan rumus :

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

3.6.3 Analisis Menggunakan FTIR

Pita-pita serapan dalam spektrum FTIR yang diperoleh dari hasil analisis digunakan untuk memastikan jenis gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa yang dianalisis.

3.6.4 Analisis Menggunakan UV-vis

Profil spektrum UV-vis yang diperoleh dari masing-masing senyawa *Schiff Base* digunakan untuk menentukan λ_{max} dan memastikan adanya ikatan rangkap C=N.

3.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan zona hambat dapat dihitung dengan cara diambil tiga titik pada area zona hambat yang digunakan sebagai diameter zona hambat. Masing-masing diameter zona hambat dikurangi diameter cakram. Kemudian ditarik nilai rata-rata dari ketiga hasil pengurangan tersebut [20].