

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama bulan Juli hingga Desember 2017. Dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas seperti gelas ukur, pipet ukur, erlenmeyer, beaker gelas, gelas arloji, corong gelas bola hisap, labu alas bulat, batu didih, pipet tetes, batang pengaduk, spatula besi, klem, statif, botol vial, botol sampel kaca, *microwave* LG tipe *MH6343BAK with Quartz Heater Technology*, seperangkat alat refluk, inkubator, tabung reaksi, laminar air flow (LAF), penggaris, kertas label, kertas saring, aluminium foil, kertas sampul coklat, mikropipet, vortex, bunsen, jarum ose, cawan petri, timbangan, autoclave, kapas, tisu, pinset, *haentoli counter*, *haemocytometer*, *spreader*, *coke bor*, *blue tip*, botol jem, mikrocup, neraca analitik Ohaus Precision Advanced, Spektrofotometer FT-IR (8400S SHIMADZU), Kromatografi gas-spektrometer massa (SHIMADZU QP2010S), dan Spektrofotometer UV-VIS *double beam* (SHIMADZU 1600 *series*).

3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu minyak jeruk purut (MJP) yang berasal dari Institut Atsiri Universitas Brawijaya, o-fenildiamin $C_6H_4(NH_2)_2$, metanol p.a, diklorometana p.a, etanol 96% *analysis*, alkohol 70%, aquades, nutrien agar, nutrien broth biakan (*EPEC*), *S. thypii* dan *S. aureus*.

1.4 Tahap Penelitian

1. Identifikasi komposisi senyawa penyusun dalam MJP
2. Sintesis benzimidazol dari sitronelal dalam MJP dengan metode *microwave* dengan variasi waktu.

3. Sintesis benzimidazol dari sitronelal dalam MJP dengan variasi pelarut.
4. Karakterisasi hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa, Spektrofotometer UV-VIS, dan Spektrofotometer Inframerah.
5. Uji antibakteri terhadap (*EPEC*), *S. thypii* dan *S. aureus*.
6. Analisis data.

1.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Identifikasi Komposisi Senyawa Penyusun dalam MJP

MJP diambil sebanyak 0,0625 mL. Identifikasi komposisi penyusun MJP dilakukan dengan menginjeksikan sampel 0,2 μ L menggunakan *syringe* pada instrumen KG-SM yang memiliki tipe Shimadzu QP2010S. Masing-masing puncak yang terdeteksi pada kromatogram dianalisis menggunakan spektra massa. Sehingga hasil akhir analisis diperoleh total ionik kromatogram (TIC) dan spektra massa dari masing-masing puncak (komponen). Adapun kondisi instrumen KG-SM yang digunakan sebagai berikut:

Gas Pembawa : He

Temperatur kolom : 40°C

Temperatur injector: 310°C

Kecepatan aliran gas: 94,7 mL/menit

Tekanan : 21,2 kPa

1.5.2 Sintesis Benzimidazol dari Sitronelal dalam MJP menggunakan Metode *microwave*

3.5.2.1 Menggunakan Pelarut Metanol

Sebanyak 0,7 gram o-fenildiamin (0,05 mol) dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang sudah berisi batu didih, ditambahkan 3 mL MJP (sitronelal 0,1 mol), lalu ditambahkan pelarut metanol sebanyak 5 mL (0,12 mol) dan ditambahkan katalis CuSO_4 sebanyak 0,01 g ($6,25 \times 10^{-4}$ mol). Setiap penambahan bahan ditutup dengan alumunium foil agar minyak atsiri tidak menguap pada temperatur ruang. Setelah tercampur dilakukan sintesis menggunakan

pemanasan dengan *microwave* pada temperatur 120°C. Setelah selesai, larutan sampel didinginkan dan dipindahkan ke dalam botol kaca tertutup dan diisolasi (dalam penuangan larutan sampel diusahakan batu didih dan katalis tidak ikut tertuang), didiamkan di dalam lemari es selama 24 jam. Kemudian disaring dan dicuci menggunakan pelarut metanol dingin diperoleh padatan. Padatan diambil kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-VIS, FTIR dan KG-SM. Dalam penelitian ini dilakukan variasi waktu sintesis 30, 40, 50, 60 dan 70 menit seperti prosedur diatas.

3.5.2.2 Menggunakan Pelarut Diklorometana

Sebanyak 0,7 gram o-fenildiamin (0,05 mol) dimasukkan kedalam labu alas bulat yang sudah berisi batu didih, ditambahkan 3 mL MJP (sitronelal 0,1 mol) dan ditambahkan pelarut diklorometana sebanyak 5 mL (0,078 mol) Setiap penambahan bahan ditutup dengan alumunium foil agar minyak atsiri tidak menguap pada temperatur ruang. Setelah tercampur dilakukan sintesis menggunakan pemanasan dengan *microwave* pada temperatur 120°C. Setelah selesai, larutan sampel didinginkan dan dipindahkan kedalam botol kaca tertutup dan diisolasi (dalam penuangan larutan sampel diusahakan batu didih tidak ikut tertuang), didiamkan didalam lemari es selama 24 jam. Kemudian disaring dan dicuci menggunakan pelarut diklorometana dingin diperoleh padatan. Padatan diambil kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-VIS, FTIR, KG-SM dan H-NMR. Dalam penelitian ini dilakukan variasi waktu sintesis 30, 40, 50, 60 dan 70 menit seperti prosedur diatas.

3.5.2.3 Sintesis Tanpa menggunakan Pelarut

Sebanyak 0,7 gram o-fenildiamin (0,05 mol) dimasukkan kedalam labu alas bulat yang sudah berisi batu didih dan ditambahkan 3 mL MJP (sitronelal 0,1 mol) dalam penambahan MJP ditutup dengan alumunium foil agar minyak atsiri tidak menguap pada temperatur ruang. Setelah tercampur dilakukan sintesis menggunakan pemanasan dengan *microwave* pada temperatur 120°C.

Dengan waktu pemanasan *microwave* selama 60 menit. Setelah selesai, kemudian larutan sampel didinginkan dan dipindahkan kedalam botol kaca tertutup dan diisolasi (dalam penuangan larutan sampel diusahakan batu didih tidak ikut tertuang), didiamkan didalam lemari es selama 24 jam. Kemudian disaring menggunakan kertas saring.

1.5.3 Karakterisasi Produk Hasil Sintesis

3.5.3.1 Karakterisasi dengan Spektrofotometer UV-VIS

Produk hasil dari *microwave* yang diperkirakan senyawa benzimidazol diencerkan dengan metanol dengan perbandingan 1:5. Ke-dua kuvet diisi metanol untuk base line dari panjang gelombang 200 nm- 400 nm. Kemudian, kuvet diganti dengan produk benzimidazol yang dilarutkan dalam metanol lalu discan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis *double beam* Shimadzu 1600 series. Kemudian diperoleh spektrum antara panjang gelombang terhadap absorbansi yang menentukan transisi elektronik pada senyawa yang dianalisis.

3.5.3.2 Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Produk hasil dari *microwave* yang diperkirakan senyawa benzimidazol diambil secukupnya dihaluskan bersamaan dengan kristal KBr kering dengan perbandingan 1 : 10 menggunakan mortar. Campuran tersebut kemudian dipress dengan alat penekan hidrolitik hingga menjadi pellet yang transparan. Kemudian pellet cuplikan tipis dimasukkan ke dalam wadah sampel spektrofotometer FT-IR Shimadzu 8400S dengan lubang mengarah ke dalam radiasi. Kemudian diperoleh spektrum antara bilangan gelombang terhadap persen transmitansi (kelimpahan) yang menentukan serapan gugus fungsi yang menyusun produk tersebut melalui vibrasi molekul.

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

Produk hasil dari *microwave* yang diperkirakan senyawa benzimidazol ditimbang sebesar 0,05 mg dan dilarutkan dalam 2 mL

metanol. Analisis produk dilakukan dengan menginjeksikan sampel 0,2 μ l menggunakan *syringe* pada instrument KG-SM Shimadzu QP2010S. Masing-masing puncak yang terdeteksi pada kromatogram akan di analisis menggunakan spektra massa. Sehingga hasil akhir analisis diperoleh total ionic chromatogram (TIC) dan spektra massa dari masing-masing komponen. Spesifikasi alat KG-SM adalah :

Jenis kolom	: Kolom kapiler <i>restrex Rtx-5</i> ,
Fasa diam	: 5% difenil atau 95% dimetil polisiloksan.
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur oven kolom	: 150°C (diprogram 5°C /menit)
Temperatur injeksi	: 300 °C
Kecepatan aliran gas	: 54.1 mL/ menit
Gas pembawa	: gas He
Tekanan	: 92.4 kPa
Total air	: 35,2 mL/menit
Kolom alir	: 0,63 mL/menit
Linear velocity	: 38 cm/detik
Split ratio	: 50
Ion source temperatur	: 200°C
Interface temperatur	: 300°C

3.5.3.4 Karakterisasi dengan H-NMR

Benzimidazol dilarutkan dalam pelarut metanol (D4) dan ditempatkan dalam tabung tipis panjang. Tabung dimasukkan dalam medan magnet dan berputar. Kemudian sampel dianalisis berdasarkan energi frekuensi radio yang diberikan dan diabsorpsi sebagai sinyal yang dideteksi.

3.5.4 Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Gram (+) dan Bakteri Gram (-)

3.5.4.1 Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri

Nutrient agar 4 gram dimasukan dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquades 200 mL. Larutan dipanaskan serta diaduk hingga larut kemudian di sterilkan. *Nutrient agar* yang telah steril sebanyak 5 mL dimasukan ke dalam tabung reaksi dan diletakan

dengan kemiringan 30-45° serta didiamkan sampai memadat. Kultur bakteri (*EPEC*), *S. thypi* dan *S. aureus* diambil sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose, lalu digoreskan zig-zag pada permukaan media agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.5.4.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Nutrient broth 1.6 gram dalam botol sampel ditambahkan aquades 200 mL. Larutan diaduk hingga larut kemudian disterilkan. *Nutrient broth* yang telah steril dimasukkan tabung reaksi. Bakteri dari media agar miring diambil sebanyak 1 ose, dicelupkan ke dalam media *nutrient broth* sampai tidak ada bakteri yang menempel pada jarum ose, kemudian diinkubasi selama 1 jam. Suspensi bakteri (*EPEC*), *S. thypi* dan *S. aureus* dihitung dibawah mikroskop menggunakan *haemocytometer* hingga diperoleh 10^5 - 10^8 CFU/mL.

3.5.4.3 Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Sumuran

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan produk benzimidazol yang optimum, etanol sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam hingga 48 jam.

Cawan petri sebanyak 4 buah yang sudah steril disiapkan. *Nutrient agar* yang sudah steril dituangkan kedalam cawan petri secara aseptis dan ditunggu hingga padat. Suspensi bakteri 100 μ L dimasukkan ke permukaan agar menggunakan mikropipet dan diratakan menggunakan *spreader*. Sumuran dilakukan dengan menggunakan *coke bor* untuk membuat lubang sebanyak 5-6 lubang yang diisi 3 lubang untuk produk padatan benzimidazol dengan variasi konsentrasi (100 , 300 dan 500 ppm), MJP, antibiotik (ampicillin) dan 1 lubang pelarut etanol sebagai kontrol positif, serta aquades sebagai kontrol negatif masing-masing sebanyak 100 μ L, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pemantauan 24 hingga 48 jam. Zona bening yang terbentuk diamati sebagai luas zona hambat.

3.5.4.4 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dengan Metode Kontak *microdilution* dengan Media Cair

Penentuan KHM dilakukan dengan metode pengenceran agar. Sebanyak 1 mL larutan uji dengan berbagai konsentrasi dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL suspensi bakteri secara aseptis menggunakan mikropipet pada setiap konsentrasi. Konsentrasi dibuat dengan berbagai variasi 3.12, 6.25, 12.5, 25 dan 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Campuran media uji dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu ruang selama 18-24 jam.

Pengenceran dilakukan dari campuran aquades dan media uji menjadi 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 dan 10^5 . Media uji diambil sebanyak 100 μL dan dimasukkan pada media nutrient agar cair. Campuran dipadatkan menggunakan metode *pour plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Jumlah koloni diamati menggunakan *haemocytometer* pada permukaan media agar padat dan dihitung.

Aktivitas antibakteri dari produk benzimidazol dinyatakan dengan nilai KHM atau kemampuan penghambatan yang dinyatakan dalam persentase. Nilai KHM diperoleh dengan menentukan konsentrasi yang menunjukkan penurunan jumlah bakteri uji sebanyak 90%.

3.5.5 Analisis Data

Massa yang diperoleh dari hasil sintesis digunakan untuk menentukan %produk dengan dibandingkan terhadap massa teoritis. % yield hasil perhitungan dibandingkan dengan %produk hasil analisis dengan KG-SM. Penentuan %Produk dihitung menggunakan persamaan :

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{massa hasil sintesis}}{\text{massa teoritis}} \times 100\%$$

Berdasarkan hasil analisis dengan Kromatografi Gas-Spektrofotometer Massa diperoleh data TIC dan spektra massa sebagai dasar perhitungan kuantitas sitronelal dalam minyak jeruk purut. Selain itu sebagai dasar perhitungan kuantitas dan kualitas hasil sintesis.

Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-VIS diperoleh profil untuk memastikan panjang gelombang maksimal sehingga dapat menentukan transisi elektronik.

Spektrofotometer FT-IR diperoleh spektrum untuk menunjukkan adanya pita serapan yang digunakan untuk memastikan jenis gugus fungsi.

Mengukur zona hambat dengan metode sumuran yang diambil dari 3 titik. Hasil diameter zona hambat tersebut dikurangi dengan diameter sumuran, lalu dibuat rata-rata zona hambat. Penentuan zona hambat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Zona hambat} = \frac{\sum \text{diameter zona hambat pada beberapa sisi sumur} - \text{diameter sumuran (5 mm)}}{3}$$

Penentuan konsentrasi hambat minimum dapat dihitung dengan menggunakan persamaan:

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

% penghambatan menunjukkan penurunan jumlah bakteri uji sebanyak 90%, N_o adalah jumlah bakteri awal dan N_t adalah jumlah bakteri akhir.