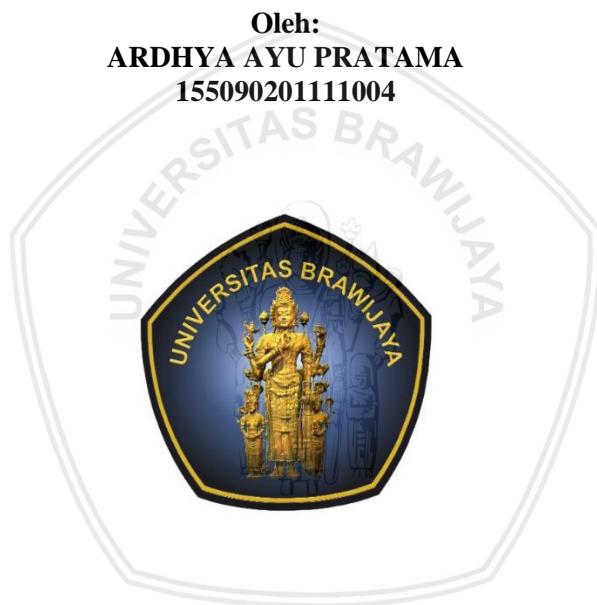


**Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari  
Eugenol melalui Reaksi Ritter dan Uji  
Toksistasnya terhadap *Artemia salina* Leach.**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ARDHYA AYU PRATAMA**  
**155090201111004**



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

repository.ub.ac.id

Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari Eugenol melalui Reaksi  
Ritter dan Uji Toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach.

SKRIPSI

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

Oleh:  
ARDHYA AYU PRATAMA  
155090201111004



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

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari Eugenol melalui Reaksi Ritter dan Uji Toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach.

Oleh:  
Ardhya Ayu Pratama  
155090201111004

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 21 Desember 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I



Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si  
NIP. 197007201997021001

Pembimbing II



Dr. Edi Priyo Utomo, MS  
NIP. 195712271986031003



Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia

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

## IDENTITAS PENGUJI

Penguji I : Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si  
NIP. 197007201997021001  
Kimia Organik

Penguji II : Dr. Edi Priyo Utomo, MS  
NIP. 195712271986031003  
Kimia Organik

Penguji III : Dr. Diah Mardiana, MS  
NIP. 196305291991032002  
Kimia Fisik



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ardhya Ayu Pratama

NIM : 15509020111104

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

**Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari Eugenol melalui Reaksi Ritter dan Uji Toksisitanya terhadap *Artemia salina* Leach.**

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Desember 2018

Yang menyatakan,



(Ardhya Ayu Pratama)

NIM. 155090201111004

**DAFTAR RIWAYAT HIDUP**

Nama : Ardhya Ayu Pratama  
NIM : 155090201111004  
Tempat, Tanggal Lahir : Blitar, 1 Juni 1997  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam  
Alamat : Jalan Candi Panggung Gang II No. 36  
Malang  
Telepon : 083841770387  
Email : [ayufandega@gmail.com](mailto:ayufandega@gmail.com)  
Status : Belum menikah

**Riwayat Pendidikan :**

1. SDN Sananwetan 1 (2003-2009)
2. SMP Negeri 3 Blitar (2009-2012)
3. SMA Negeri 2 Blitar (2012-2015)
4. Jurusan Kimia FMIPA UB (2015-2018)

**Riwayat Kepanitiaan :**

1. Staf Sie Kesehatan PK2J *Golden Chemistry* (2016)
2. Staf Sie Dekdok Pengabdian Masyarakat  
HMK UB (2016)
3. Staf Sie PDD *Chemistry Talkshow* (2017)

**Prestasi :**

1. Juara II LKTI HALAL PATIKA LPPOM (2018)  
MUI DIY

Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari Eugenol melalui Reaksi Ritter dan Uji Toksisitanya terhadap *Artemia salina* Leach.

## ABSTRAK

Eugenol atau *4-allyl-2-methoxyphenol* merupakan komponen utama dalam minyak cengkeh yang dapat dijadikan sebagai *starting material* dalam sintesis, salah satunya adalah sintesis melalui reaksi Ritter. Eugenol sebagai prekursor karbokation direaksikan dengan asetonitril, dan penambahan katalis asam kuat yaitu  $H_2SO_4$  untuk membentuk senyawa organonitrogen. Jumlah mol dalam reaksi eugenol: asetonitril:  $H_2SO_4$  berturut-turut sebesar 0,1: 0,5: 0,1 mol. Reaksi dilakukan pada suhu es ( $0^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam, suhu ruang ( $27^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam, dan suhu refluks ( $90^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4, 8, dan 16 jam. Hasil reaksi dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, IR, dan GC-MS. Reaksi pada suhu es ( $0^\circ C$ ) dan suhu ruang ( $27^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam tidak menghasilkan senyawa organonitrogen. Sedangkan reaksi pada suhu refluks ( $90^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam menghasilkan senyawa organonitrogen yaitu eugenil asetamida. Hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 8, dan 16 jam menunjukkan terbentuknya senyawa organonitrogen yaitu senyawa eugenil asetamida dan senyawa isoquinolina yang kuantitasnya semakin meningkat dengan semakin lamanya waktu reaksi. Hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 16 jam diuji sifat toksisitasnya menggunakan metode *Brain Shrimp Lethality Test* terhadap *Artemia salina* menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 16 ppm dan digolongkan mempunyai aktivitas toksisitas kuat.

Kata kunci: Eugenol, reaksi Ritter, *Brain Shrimp Lethality Test*, *Artemia salina*.

Study of Synthesis of Organonitrogen Compounds from Eugenol through The Ritter Reaction and The Toxicity Test on *Artemia salina* Leach.

## ABSTRACT

Eugenol or 4-allyl-2-methoxyphenol is the main component in clove oil which can be used as a starting material in synthesis, one of the example is synthesis through the Ritter reaction. Eugenol as a carbocation precursor is reacted with acetonitrile, and the addition of a strong acid catalyst is  $\text{H}_2\text{SO}_4$  to form organonitrogen compounds. The number of moles in the reaction of eugenol: acetonitrile:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  is 0,1: 0,5: 0,1 mol. The reaction was carried out at ice temperature ( $0^\circ\text{C}$ ) with 4 hours reaction time, room temperature ( $27^\circ\text{C}$ ) with 4 hours reaction time, and reflux temperature ( $90^\circ\text{C}$ ) with 4, 8 and 16 hours reaction times. The reaction results were characterized using UV-Vis, IR, and GC-MS spectrophotometers. Reactions at ice temperature ( $0^\circ\text{C}$ ) and room temperature ( $27^\circ\text{C}$ ) with 4 hours reaction time of 4 hours do not produce organonitrogen compounds. While at reflux temperature ( $90^\circ\text{C}$ ) with 4 hours reaction time produces organonitrogen compounds, eugenyl acetamide. The reaction results at the reflux temperature ( $90^\circ\text{C}$ ) with 8, and 16 hours reaction times are organonitrogen compounds namely eugenyl acetamide compounds and isoquinolina compounds whose quantities increased with increasing reaction time. The reaction results at reflux temperature ( $90^\circ\text{C}$ ) with a reaction time of 16 hours was tested its toxicity level using the Brain Shrimp Lethality Test method to *Artemia salina* showed the value of  $\text{LC}_{50}$  was 16 ppm and classified as strong toxicity activity.

Keywords: Eugenol, Ritter reaction, Brain Shrimp Lethality Test, *Artemia salina*.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penyusunan naskah skripsi yang berjudul **Studi Sintesis Senyawa Organonitrogen dari Eugenol melalui Reaksi Ritter dan Uji Toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach.** dengan tepat waktu. Penulisan skripsi merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

Dalam penelitian hingga penyusunan skripsi ini, banyak sekali pihak yang turut membantu, mengarahkan, maupun membimbing penulis. Penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah mendukung kelancaran dalam penyusunan skripsi ini:

1. Bapak Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang selalu memberikan arahan dengan penuh kesabaran kepada penulis agar dapat melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi dengan baik.
2. Bapak Dr. Edi Priyo Utomo, MS selaku Dosen Pembimbing II yang selalu memberikan arahan dengan penuh kesabaran kepada penulis agar dapat melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi dengan baik.
3. Bapak Drs. Budi Kamulyan, M.Sc selaku dosen penasehat akademik yang selalu memberikan arahan dan masukan kepada penulis selama penulis menempuh studi.
4. Bapak Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberikan ijin penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Institut Atsiri.
5. Keluarga yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada penulis baik secara moral dan material untuk menyelesaikan studi.
6. Ibu Dr. Elvina Dhiaul Iftitah, S.Si., M.Si selaku Kepala Laboratorium Kimia Organik, Bapak Lukman Hakim, S.Si., M.Sc., Dr.Sc selaku Kepala Laboratorium Kimia Dasar, serta Bapak Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc selaku Kepala

- Laboratorium Instrumen yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian.
7. Bapak Widji Sulistijo selaku PLP Kimia Organik, Ibu Nur Yusrina dan Ibu Soerjani Widyastuti, S.Kom selaku PLP Kimia Dasar, serta Bapak Hadi Kurniawan, A.Md. selaku PLP Instrumen yang telah membantu penulis selama penelitian.
  8. Seluruh karyawan administrasi Kimia yang telah membantu dan memudahkan penulis dalam menyelesaikan segala urusan administrasi skripsi.
  9. Teman-teman seperjuangan yang selalu mendukung dan membantu penulis dengan tulus dan ikhlas.
  10. Segala pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang turut membantu penulis selama penelitian dan menyusun skripsi.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis sendiri dan pembaca.

Malang, 21 Desember 2018  
Penulis,

Ardhya Ayu Pratama  
NIM. 155090201111004

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....	ii
IDENTITAS PENGUJI.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN .....	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP .....	iii
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG .....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2. Perumusan masalah .....	3
1.3. Batasan masalah.....	3
1.4. Tujuan penelitian .....	3
1.5. Manfaat penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Eugenol.....	5
2.2 Reaksi Ritter .....	6
2.3 Spektrofotometer UV-Vis .....	8
2.4 Spektrofotometer IR .....	9
2.5 Spektrofotometer GC-MS .....	11
2.6 Uji Toksisitas dengan metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> .....	12
2.7 <i>Artemia salina</i> Leach. ....	14
2.8 Hipotesis .....	15
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
3.1 Tempat dan waktu penelitian .....	17
3.2 Alat dan bahan .....	17
3.2.1 Alat .....	17
3.2.2 Bahan.....	17

3.3 Tahapan penelitian.....	17
3.4 Prosedur kerja.....	18
3.4.1 Sintesis senyawa organonitrogen dengan variasi suhu.....	18
3.4.2 Sintesis senyawa organonitrogen dengan variasi waktu.....	18
3.4.3 Karakterisasi produk reaksi.....	19
3.4.3 Uji toksisitas menggunakan metode <i>Brain Shrimp Lethality Test</i> .....	20
3.4.4 Analisis data.....	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Sintesis organonitrogen dari eugenol dan asetonitril dengan variasi suhu dan waktu reaksi.....	23
4.2 Karakterisasi dengan spektrofotometri UV-Vis.....	24
4.3 Karakterisasi dengan spektrofotometri IR.....	26
4.4 Karakterisasi dengan spektrofotometri GC-MS.....	29
4.5 Uji Toksisitas menggunakan metode <i>Brain Shrimp Lethality Test</i> terhadap <i>Artemia salina</i> .....	42
BAB V PENUTUP.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	51

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b> Struktur kimia eugenol .....	5
<b>Gambar 2.2.</b> Reaksi Ritter secara umum .....	6
<b>Gambar 2.3.</b> Produk reaksi Ritter dengan starting material eugenol	6
<b>Gambar 2.4.</b> Mekanisme reaksi Ritter .....	7
<b>Gambar 2.5</b> Spektrum UV-Vis Eugenol .....	8
<b>Gambar 2.6</b> Spektrum UV-Vis Isoquinolina .....	9
<b>Gambar 2.7</b> Spektrum IR Eugenol .....	10
<b>Gambar 2.8</b> Spektrum IR Isoquinolina .....	11
<b>Gambar 2.9</b> Spektrum massa eugenol .....	12
<b>Gambar 2.10</b> Spektrum massa Isoquinolina .....	12
<b>Gambar 2.11.</b> Kurva hubungan dosis-respon .....	14
<b>Gambar 2.12.</b> Artemia salina .....	14
<b>Gambar 3. 1</b> Kondisi alir selama analisis instrumen GC-MS.....	20
<b>Gambar 4. 1</b> Transisi elektron dalam senyawa eugenol.....	24
<b>Gambar 4. 2</b> Spektrum UV-Vis dari eugenol dan hasil reaksi.....	25
<b>Gambar 4. 3</b> Spektrum IR hasil reaksi pada suhu es (0°C).....	26
<b>Gambar 4. 4</b> Spektrum IR senyawa eugenol standart.....	26
<b>Gambar 4. 5</b> Spektrum IR hasil reaksi pada suhu ruang (27°C) .....	27
<b>Gambar 4. 6</b> Spektrum IR hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 4 jam .....	28
<b>Gambar 4. 7</b> Spektrum IR hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 8 jam .....	29
<b>Gambar 4. 8</b> Spektrum IR hasil reaksi suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 16 jam .....	29
<b>Gambar 4. 9</b> Kromatogram hasil reaksi pada suhu es (0°C) .....	30
<b>Gambar 4. 10</b> Kromatogram hasil reaksi pada suhu ruang (27°C) .	30
<b>Gambar 4. 11</b> Spektrum massa hasil reaksi suhu es (0°C) dan suhu ruang (27°C) sesuai puncak $t_R = 21,588$ . .....	31
<b>Gambar 4. 12</b> Pola fragmentasi dari senyawa eugenol .....	31
<b>Gambar 4. 13</b> Kromatogram hasil reaksi dari suhu refluks (90°C).	32
<b>Gambar 4. 14</b> Spektrum massa hasil reaksi dari refluks (90°C) sesuai puncak kedua $t_R = 21,864$ .....	32

<b>Gambar 4. 15</b>	Pola fragmentasi senyawa eugenil asetamida .....	33
<b>Gambar 4. 16</b>	Struktur N-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propanyl] acetamide .....	33
<b>Gambar 4. 17</b>	Kromatogram hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 8 jam .....	34
<b>Gambar 4. 18</b>	Spektrum massa produk reaksi suhu refluks (90°C) waktu reaksi 8 jam sesuai puncak $t_R = 18,657$ .....	34
<b>Gambar 4. 19</b>	Pola fragmentasi dari senyawa isoquinolina .....	35
<b>Gambar 4. 20</b>	Struktur dari senyawa isoquinolina (6-methoxy-1,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-7-ol) .....	36
<b>Gambar 4. 21</b>	Kromatogram hasil reaksi produk suhu refluks (90°C) waktu reaksi 16 jam .....	36
<b>Gambar 4. 22</b>	Spektrum massa hasil reaksi suhu refluks (90°C) waktu reaksi 16 jam sesuai puncak $t_R = 18,675$ .....	37
<b>Gambar 4. 23</b>	Grafik area dari prekursor dan hasil sintesis senyawa organonitrogen .....	39
<b>Gambar 4. 24</b>	Pembentukan karbokation .....	40
<b>Gambar 4. 25</b>	Pembentukan ion nitrilium .....	41
<b>Gambar 4. 26</b>	Pembentukan senyawa organonitrogen .....	41

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4. 1</b> Komponen dari hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 8 jam .....	34
<b>Tabel 4. 2</b> Komponen dari hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 16 jam.....	37
<b>Tabel 4. 3</b> Hasil analisis GC-MS .....	38
<b>Tabel 4. 4</b> Nilai mortalitas masing-masing konsentrasi larutan uji .	43
<b>Tabel 4. 5</b> Nilai LC <sub>50</sub> dengan metode Brain Shrimp Lethality Test .	43



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Tahapan Penelitian .....	51
<b>Lampiran 2.</b> Perhitungan volume selama sintesis .....	49
<b>Lampiran 3.</b> Perhitungan Yield.....	50
<b>Lampiran 4.</b> Preparasi Larutan Uji untuk Uji Toksisitas .....	51
<b>Lampiran 5.</b> Perhitungan Hasil Uji Toksisitas .....	54
<b>Lampiran 6.</b> Foto kegiatan penelitian .....	57



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<b>Simbol/ Singkatan</b>	<b>Keterangan</b>
BSLT	<i>Brain Shrimp Lethality Test</i>
LC <sub>50</sub>	<i>Lethal Concentration</i>
DMSO	Dimetil sulfoksida



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Masyarakat Indonesia telah lama menggunakan bahan alam terutama bahan alam yang berasal dari tanaman dalam praktik medis sebagai media pengobatan terhadap suatu penyakit. Tanaman-tanaman yang terdapat di alam tersebut dapat diekstrak bagian daun, bunga, batang, maupun bijinya menjadi minyak atsiri. Tanaman minyak atsiri banyak tumbuh di Indonesia. Minyak atsiri mengandung senyawa-senyawa metabolit yang berperan sebagai penghasil aktivitas farmakologis, diantaranya sebagai obat, antioksidan, zat pewarna, penambah aroma dalam makanan, parfum, dan bahkan insektisida [1].

Salah satu sumber daya alam Indonesia yang banyak tumbuh dan dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Produksi minyak cengkeh dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*) melalui destilasi uap banyak dilakukan di Indonesia. Minyak cengkeh memiliki beberapa aktivitas biologis diantaranya sebagai antiseptik, antiplasmadik, stimulant, dan juga anastesi lokal. Komponen utama yang terkandung dalam minyak cengkeh diantaranya eugenol, asetil eugenol, beta kariofilena, dan vanillin. Senyawa lain yang terkandung dalam minyak cengkeh yaitu tannin, metil salsilat, senyawa flavonoid eugenin, khaemferol, asam katekolat, serta senyawa triterpenoid asam oleoat, stigmasterol, dan kampesterol dalam jumlah yang kecil [2].

Komponen utama dari minyak cengkeh yaitu eugenol. Eugenol termasuk dalam kelompok alil benzena dari senyawa fenol. Dalam minyak cengkeh kandungan eugenol (*4-allyl-2-methoxyphenol*) mencapai 80%-95%. Berdasarkan studi farmakologi menunjukkan bahwa eugenol memiliki efek antikonvulsan, anastesi lokal, antistress, bakteristatik, bakterisida, antikandida, antijamur, antigenotoksik, dan berpotensi sebagai anti kanker [3].

Berdasarkan strukturnya eugenol (*4-allil-2-metoksifenol*) yang terdapat pada minyak cengkeh (80-90%) berpotensi sebagai *starting material* dalam penyediaan senyawa organonitrogen aromatik.

Sintesis dari senyawa aromatik seperti eugenol dapat dilakukan dalam satu tahapan reaksi melalui reaksi Ritter sehingga tahap sintesis menjadi lebih efisien [4].

Eugenol yang direaksikan dengan senyawa golongan nitril seperti asetonitril atau benzonitril dengan katalis asam untuk membentuk senyawa organonitrogen. Terjadi reaksi pemutusan ikatan  $\pi$  pada gugus alkena eugenol dan pembentukan ikatan C-N amida [5]. Eugenol akan membentuk karbokation saat didehidrasi dengan asam, akibat terjadinya protonasi. Karbokation yang terbentuk akan diserang nukleofilik atom nitrogen dari senyawa nitril dan terbentuk senyawa organonitrogen.

Senyawa organonitrogen merupakan senyawa heteroatom dengan adanya gugus N. Gugus heteroatom tersebut menyebabkan senyawa organonitrogen dengan afinitas dan polaritasnya membuat terjadinya mekanisme biokimia membuat terjadinya interaksi molekuler dalam tubuh. Interaksi yang terjadi membuat organonitrogen memiliki aktivitas biologis sebagai antivirus, analgesik, antiinflamasi, andidepresan, anti tumor, anti virus, dan anticonsvulsan [6].

Penelitian dengan melibatkan senyawa organonitrogen pernah dilakukan oleh Rahman, dkk. (2006) dengan melakukan sintesis Senyawa organonitrogen melalui reaksi Ritter dari metileugenol dengan variasi suhu refluks dan suhu kamar dengan yield pada suhu refluks lebih besar daripada saat suhu ruang [7]. Selain itu, penelitian lain dilakukan oleh Fatma, dkk. (2013), mengenai sintesis senyawa organonitrogen berbasis  $\alpha$ -pinena melalui reaksi Ritter, produk reaksi yang dihasilkan meningkat seiring bertambahnya waktu [8]. Berdasarkan penelitian diatas, variasi waktu dan juga temperatur belum pernah dilakukan untuk sintesis senyawa organonitrogen dari eugenol melalui reaksi Ritter.

Penelitian lebih lanjut dengan melakukan sintesis senyawa organonitrogen dari eugenol melalui reaksi Ritter terhadap pengaruh perlakuan suhu dan waktu reaksi yang dibuat bervariasi, serta pengujian toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach melalui metode *Brain Shrimp Lhetality Test*.

## 1.2. Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ), suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ), dan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) terhadap produk reaksi Ritter antara eugenol dengan asetonitril?
2. Bagaimana pengaruh dari variasi waktu proses reaksi terhadap senyawa organonitrogen yang diperoleh?
3. Bagaimana tingkat toksisitas senyawa organonitrogen dari produk reaksi berdasarkan nilai  $\text{LC}_{50}$ ?

## 1.3. Batasan masalah

Batasan masalah dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. *Starting material* yang digunakan dalam sintesis merupakan eugenol murni.
2. Variasi waktu reaksi yang diberikan selama proses sintesis adalah 4, 8, dan 16 jam.
3. Analisis terhadap toksisitas dari senyawa organonitrogen menggunakan uji dengan metode *Brain Shrimp Lethality Test* (BSLT).

## 1.4. Tujuan penelitian

Berdasarkan uraian diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ), suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ), dan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) terhadap produk reaksi Ritter antara eugenol dengan asetonitril.
2. Mengetahui pengaruh dari variasi waktu proses reaksi terhadap senyawa organonitrogen yang diperoleh.
3. Mengetahui tingkat toksisitas senyawa organonitrogen dari produk reaksi berdasarkan nilai  $\text{LC}_{50}$ .

## 1.5. Manfaat penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Eugenol yang dimanfaatkan sebagai *starting material* sintesis Senyawa organonitrogen diharapkan memiliki kemampuan sebagai senyawa obat. Dengan demikian penyediaan obat dapat dilakukan dengan memanfaatkan bahan alam Indonesia yang berdampak pada pengembangan teknologi obat masa depan yang harganya terjangkau masyarakat.
2. Metode penelitian ini bisa dikembangkan untuk pengelolaan bahan alam lainnya terutama derivatisasi struktur dan penciptaan senyawa-senyawa baru bernilai guna tinggi dalam rangka memenuhi kebutuhan masyarakat berbasis bahan alam Indonesia yang berdampak pada kemandirian bangsa.



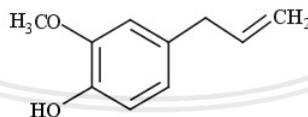
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Eugenol

Eugenol (*4-allyl-2-methoxyphenol*) merupakan komponen utama minyak cengkeh mencapai 80%-95%. Selain terdapat pada minyak cengkeh, eugenol juga dapat ditemukan pada tanaman kayu manis (*cinnamon*), pala (*nutmeg*), dan basil [3]. Eugenol yang memiliki bau yang kuat dapat digunakan sebagai bumbu dapur, hingga antiseptik gigi karena memiliki efek yang sama seperti deterjen. Dalam dunia kedokteran terutama kedokteran gigi eugenol menjadi agen terapeutik untuk sedasi pasien yang sakit gigi, pulpitis, dan hiperalgnesia gigi [9].

Eugenol adalah senyawa fenolik, turunan dari senyawa fenol. Eugenol merupakan fenilpropena, guaiacol dengan ikatan alil tersubstitusi [10]. Eugenol banyak digunakan sebagai *starting material* dalam proses sintesis. Hal ini karena eugenol termasuk dalam kelompok gugus fungsional yang dapat dimodifikasi menjadi senyawa baru [11].

Berdasarkan studi farmakologi menunjukkan bahwa eugenol memiliki efek antikonvulsan, anestesi lokal, antistress, bakteristatik, bakterisida, antikandida, antijamur, antigenotoksik, dan berpotensi sebagai anti kanker. Berikut merupakan struktur kimia dari eugenol [3]:



**Gambar 2.1.** Struktur kimia eugenol

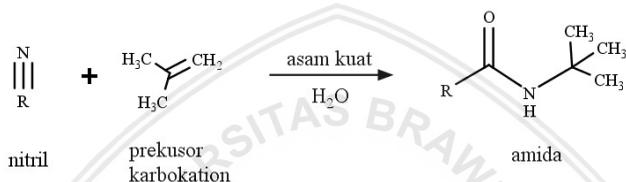
Terdapat beberapa metode untuk mendapatkan eugenol dari minyak cengkeh diantaranya dengan metode ekstraksi asam basa dengan melalui proses penyabunan dan menggunakan metode destilasi untuk mengurangi tekanan. Rahman dkk., mengisolasi eugenol dari minyak cengkeh dengan metode destilasi fraksinasi menghasilkan rendemen 70,66% dengan kemurnian 100% yang

repository.ub.ac.id

dapat digunakan sebagai starting material sintesis berbasis eugenol sebagai bahan utama dalam minyak cengkeh [12].

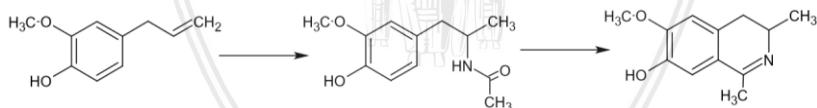
## 2.2 Reaksi Ritter

Reaksi Ritter merupakan reaksi antara alkohol atau alkena dengan senyawa nitril menggunakan katalis asam kuat untuk mengonversi nitril menjadi amida. Katalis asam kuat yang digunakan selama proses reaksi berperan untuk menghasilkan karbokation. Ion karbenium yang dihasilkan dari pengasaman menggunakan asam kuat akan bereaksi dengan nitril menghasilkan amida. Berikut merupakan Reaksi Ritter [13]:



Gambar 2.2. Reaksi Ritter secara umum

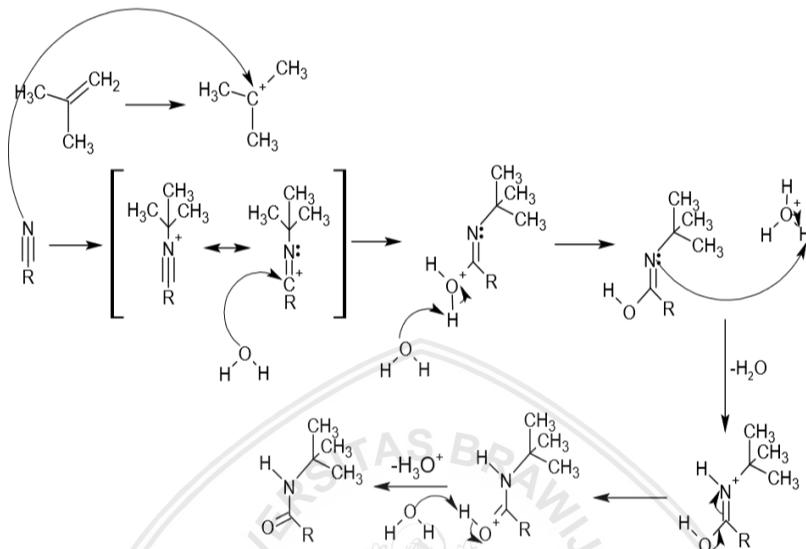
Reaksi terjadi dalam *starting material* eugenol, melalui mekanisme abstraksi proton oleh gugus alkena eugenol membentuk karbokation dilanjutkan adisi nitril oleh senyawa asetonitril dengan membentuk ikatan baru amida [4].



Gambar 2.3. Produk reaksi Ritter dengan *starting material* eugenol

Efektivitas reaksi Ritter sangat dipengaruhi oleh dua hal yaitu stabilitas karbokation dan efek sterik. Stabilitas karbokation akan meningkat jika reaksi dilaksanakan pada medium polar yang memungkinkan terjadinya interaksi elektrostatis antara medium (pelarut) dengan spesi karbokation. Sementara itu efek sterik terkait dengan kerangka molekul reaktan yang terlibat dalam reaksi, semakin besar kerangka molekul maka dapat menghalangi proses

serah terima elektron dalam pembentukan ikatan baru [13]. Berikut merupakan mekanisme reaksi dari reaksi Ritter:



**Gambar 2.4.** Mekanisme reaksi Ritter

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi produk reaksi yang dihasilkan dari reaksi Ritter diantaranya temperatur selama reaksi. Rahman, dkk. (2006), melakukan sintesis Senyawa organonitrogen yang melalui reaksi Ritter dari metileugenol dengan variasi suhu refluks dan suhu kamar. Perlakuan pada suhu refluks menunjukkan jika yield yang dihasilkan sebesar 32,81g. Hasil tersebut lebih besar dibandingkan dengan produk yang didapatkan saat reaksi dilakukan pada suhu ruang dengan yield 5g. Produk dari suhu refluks lebih besar karena tercapainya energi aktivasi selama reaksi sehingga terpenuhinya persyaratan termodinamika [7].

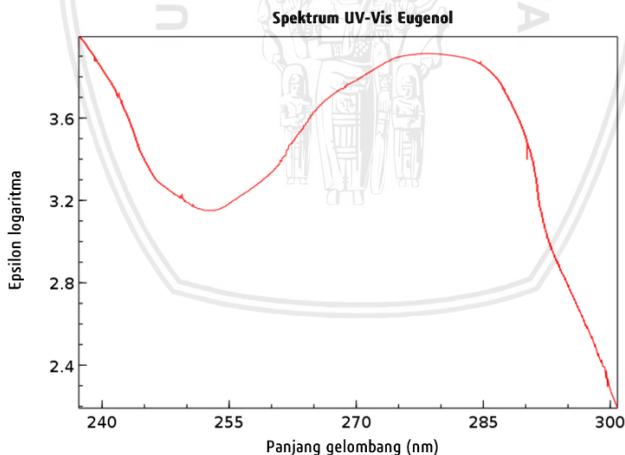
Waktu reaksi juga mempengaruhi produk yang dihasilkan dari reaksi Ritter. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Fatma, dkk. (2013), mengenai sintesis senyawa organonitrogen berbasis  $\alpha$ -pinena melalui reaksi Ritter, produk reaksi yang dihasilkan meningkat seiring bertambahnya waktu reaksi yang diberikan pada senyawa yang memiliki intermediet stabil. Waktu reaksi yang digunakan yaitu 6, 10, dan 15 jam [8].

## 2.3 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur jumlah radiasi dari dua berkas cahaya ultraviolet yang diserap oleh zat yang terdapat dalam suatu larutan. Metode ini sering digunakan dalam analisis terutama dalam bidang kesehatan terutama farmasi [14].

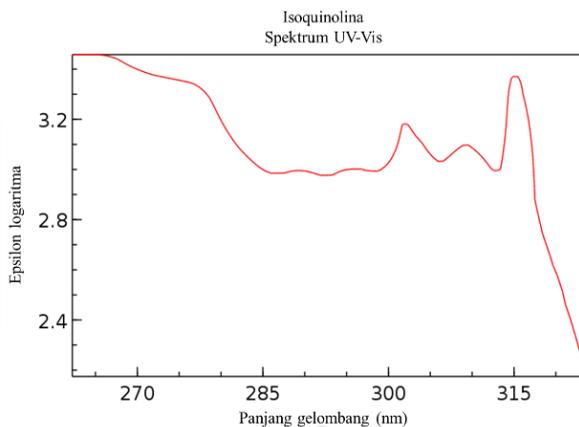
Analisis yang dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis yaitu analisis secara kuantitatif dan kualitatif. Secara kuantitatif digunakan untuk menentukan jumlah dari spesi molekul yang dapat menyerap energi radiasi berdasarkan hukum Lambert-Beer. Sedangkan secara kualitatif digunakan untuk mengidentifikasi senyawa organik yang terdapat dalam sampel yang dianalisis berdasarkan transisi elektron yang terjadi [14].

Suatu zat obat yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometer dipreparasi dengan konsentrasi yang sesuai agar menghasilkan absorbansi 0,9 untuk dihasilkan ketepatan pengukuran optimal. Nilai panjang gelombang yang digunakan yaitu  $\lambda_{\text{max}}$  yang memberikan kesalahan kecil [14].



**Gambar 2.5** Spektrum UV-Vis Eugenol

Spektrum UV-Vis Eugenol menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 280 nm ( $\log \epsilon$  3.9) [15].



**Gambar 2.6** Spektrum UV-Vis Isoquinolina

Sedangkan absorbansi maksimum dari isoquinolina terdapat pada panjang gelombang 315 nm ( $\log \epsilon$  3.38) [16].

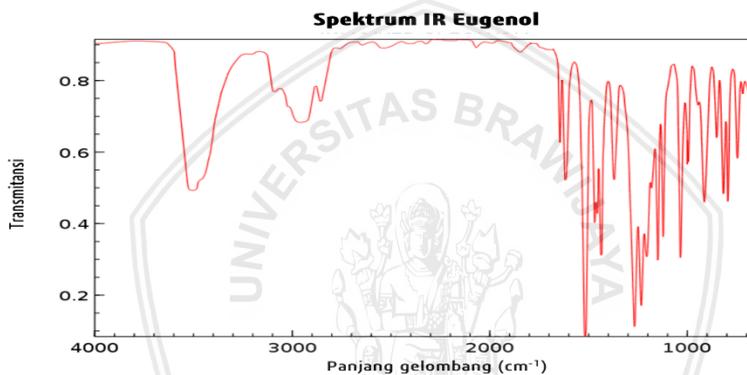
Kromofor merupakan suatu gugus yang menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak. Alkena memiliki panjang gelombang maksimum 177 nm dengan transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$ , amida memiliki panjang gelombang maksimum pada 214 nm dengan transisi elektron  $n \rightarrow \pi^*$ . Senyawa nitril ( $C=N$ ) dan karbonil ( $C=O$ ) memiliki transisi elektron  $n \rightarrow \pi^*$ . Gugus auksokrom yang terikat pada kromofor membuat pita absorpsi bergeser. Auksokrom merupakan gugus yang memiliki elektron bebas, seperti  $-OH$ ,  $-O$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$ . Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 200-400 nm hanya dapat mendeteksi senyawa dengan transisi  $n \rightarrow \pi^*$  dan  $\pi \rightarrow \pi^*$  [17].

## 2.4 Spektrofotometer IR

Spektrofotometer IR merupakan instrumen yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu molekul. Spektrofotometer IR menghasilkan data dalam bentuk spektrum yang menunjukkan gugus fungsi yang menyerap energi radiasi. Molekul dikenai inframerah sehingga membuat molekul mengalami transisi dari *ground state* ke *excited state*. Vibrasi terjadi saat molekul menyerap energi inframerah. Molekul hanya menyerap energi radiasi yang sesuai

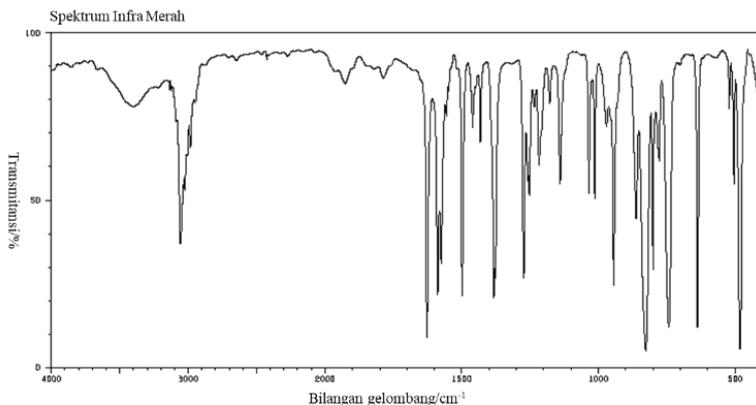
dengan jenis atom. Energi lebih tinggi saat vibrasi lebih cepat karena atom yang ringan [18].

Analisis yang dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri IR yaitu, analisis kuantitatif dan kualitatif. Analisis secara kuantitatif digunakan untuk mengetahui nilai absorbtivitas molar ( $\epsilon$ ) suatu senyawa pada panjang gelombang tertentu. Sedangkan analisis secara kualitatif digunakan untuk mengetahui gugus fungsional spesifik yang menyerap energi radiasi ditunjukkan dengan terbentuknya puncak-puncak serapan dengan intensitas berbeda akibat pengaruh jenis vibrasi (*stretching* yang mengakibatkan perubahan panjang ikatan atau *bending* yang mengakibatkan perubahan panjang ikatan) dan dihasilkan dalam bentuk spektrum IR [18].



**Gambar 2.7** Spektrum IR Eugenol

Spektrum IR eugenol menunjukkan pita serapan muncul pada bilangan gelombang  $3618.39 \text{ cm}^{-1}$  dari regangan O-H *stretching*,  $1432.23 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1462.36 \text{ cm}^{-1}$  dari regangan C-C *stretching* dalam cincin,  $1514.40 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1613.45 \text{ cm}^{-1}$  dari *stretching* senyawa aromatis, dan  $1235.13 \text{ cm}^{-1}$  dari regangan C-O *stretching*. Selanjutnya, ikatan  $\text{sp}^3$  C-H *stretching* pada bilangan gelombang  $3004.60\text{-}2843.62 \text{ cm}^{-1}$ [15].

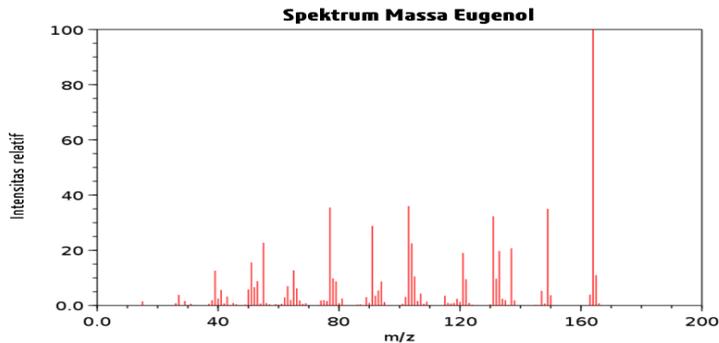


**Gambar 2.8** Spektrum IR Isoquinolina

Beberapa pita serapan muncul dari hasil analisis menggunakan instrumentasi spektrofotometri FTIR seperti pada Gambar 2.8. Adanya pita serapan senyawa aromatis *stretching* yang tajam pada bilangan gelombang  $1675\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan pada  $1900\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan  $\text{C}=\text{N}$  *stretching*. Pita serapan  $2000\text{--}1666\text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas lemah menunjukkan ciri khas serapan aromatis jenis disubstitusi *stretching*. Ikatan  $\text{C}-\text{N}$  *stretching* yang ditunjukkan oleh pita serapan pada bilangan gelombang  $1300\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ . Selanjutnya, ikatan  $\text{sp}^3\text{ C}-\text{H}$  *stretching* pada bilangan gelombang  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas sedang [19].

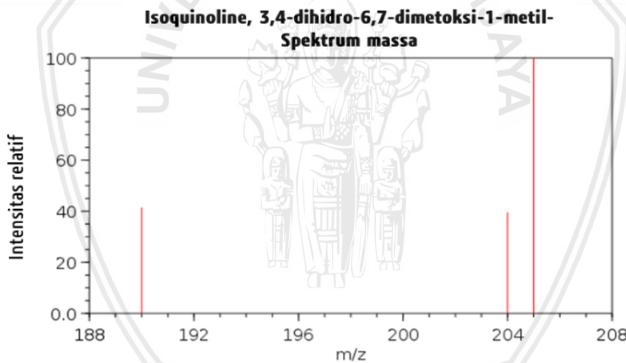
## 2.5 Spektrofotometer GC-MS

Spektrofotometer GC-MS merupakan instrumen untuk menyeleksi molekul obat. Kromatografi gas (GC) dapat memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam campuran. Hal tersebut membuat spektrofotometer GC-MS merupakan metode deteksi obat yang paling sensitif. Senyawa akan diserap oleh fasa diam berdasarkan sifat mudah menguapnya dan juga polaritas [20]. Spektroskopi massa (MS) akan menganalisis senyawa-senyawa yang sudah terpisahkan. Senyawa ditembak dengan elektron dan menjadi ion-ion yang terdeteksi menjadi rasio  $m/z$  [21].



**Gambar 2.9** Spektrum massa eugenol

Eugenol memiliki waktu retensi pada 22,5 menit [22]. Spektrum massa dari eugenol dapat ditunjukkan seperti pada gambar. Eugenol memiliki m/z 164 sebagai base peak. Fragmentasi ion dari eugenol yaitu m/z 164, m/z 149, m/z 137, m/z 131, m/z 121, m/z 103, m/z 91, m/z 77, m/z 65, m/z 55, m/z 51, dan m/z 39 [15].



**Gambar 2.10** Spektrum massa Isoquinolina

Sedangkan senyawa isoquinolina memiliki base peak pada m/z 205, puncak tertinggi kedua pada m/z 190, dan puncak tertinggi ketiga pada m/z 204 [23].

## 2.6 Uji Toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

*Brine Shrimp Lethality Test* merupakan metode yang sensitif untuk melakukan uji toksisitas terutama dari bahan alam. Metode ini

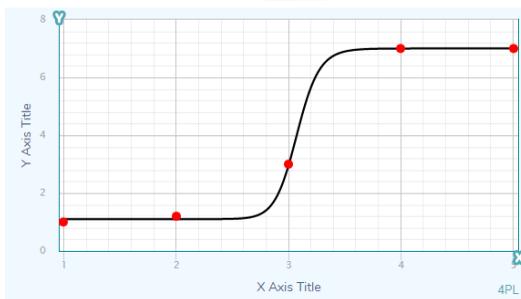
menggunakan telur *Artemia salina* yang sebelumnya harus ditetaskan terlebih dahulu. Telur akan menetas saat berada dalam kondisi air garam, pH optimal dalam kisaran 8, serta diperlukan adanya oksigen dan sumber cahaya. Selanjutnya dilakukan proses inkubasi selama 36-48 jam pada suhu kamar (28-30<sup>0</sup>C) [24].

Metode *Brain Shrimp Lethality Test* merupakan metode yang murah, cepat, dan sederhana. Metode ini secara *in vivo* bersifat toksik terhadap organisme hewan sederhana. Setelah pengujian dilakukan perhitungan persen kematian. Hubungan antara konsentrasi dengan molaritas produk hasil reaksi yang diujikan dinyatakan sebagai median konsentrasi mematikan atau LC<sub>50</sub>. Median konsentrasi mematikan merupakan setengah kematian dari subjek tes dalam waktu tertentu dan dinyatakan dalam regresi linear [25]. Nilai LC<sub>50</sub> suatu senyawa dibawah 100 µg/mL dikategorikan sebagai aktivitas toksisitas tinggi, nilai LC<sub>50</sub> diantara 100 µg/mL – 500 µg/mL dikategorikan sebagai aktivitas toksisitas medium, dan nilai LC<sub>50</sub> diantara 500 µg/mL – 1000 µg/mL dikategorikan sebagai aktivitas toksisitas rendah [26].

Penentuan Nilai LC<sub>50</sub> melalui persamaan *four parameter logistic equation* yang sesuai dengan kurva dosis-respon dengan kemiringan slope variabel.

$$y = \min + \frac{\text{maks} - \min}{1 + \left(\frac{x}{\text{LC}_{50}}\right)^{-\text{hillslope}}} \quad (2.6)$$

dengan min merupakan kurva bagian bawah, maks merupakan kurva bagian atas, LC<sub>50</sub> merupakan nilai x untuk titik kurva yang berada ditengah parameter min dan maks, dan *hillslope* merupakan kemiringan kurva pada titik tengah. Berikut merupakan kurva hubungan dosis-respon [27]:



### Gambar 2.11. Kurva hubungan dosis-respon

Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan dengan menggunakan tikus sebagai hewan uji, didapatkan nilai LD<sub>50</sub> oral dari eugenol sebesar 2,650 mg/kg. Selain itu, ditemukan bahwa eugenol memiliki sifat sitotoksik pada sel osteoblastik U2OS pada manusia dalam penelitian secara *in vitro*. Eugenol juga bersifat sitotoksik terhadap sel kulit manusia pada konsentrasi 0,03% (v/v). Eugenol juga telah ditemukan untuk mengurangi kerusakan DNA dari karsinogen [28].

### 2.7 *Artemia salina* Leach.

*Artemia salina* dapat bertahan hidup dalam salinitas air yang beragam. Namun habitat dari *Artemia salina* yaitu pada air garam atau air laut. Suhu reproduksi optimal sekitar 25<sup>0</sup>C atau dalam suhu kamar. *Artemia salina* mencapai 8-10 mm saat dewasa, tergantung dari lingkungannya. Berikut merupakan klasifikasi *Artemia salina* [29]:

Kingdom	: Animalia
Class	: Branchiopoda
Order	: Anostraca
Family	: Artemiidae
Genus	: Artemia
Spesies	: <i>Artemia salina</i>



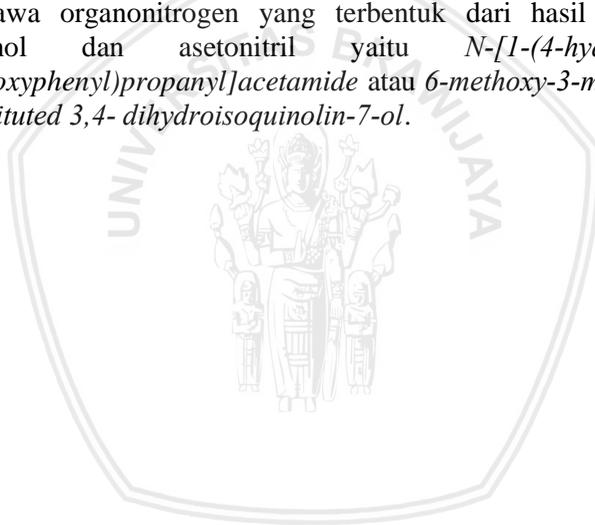
**Gambar 2.12.** *Artemia salina*

Telur *Artemia salina* hanya dapat menetas dalam kondisi optimumnya yaitu saat range suhu sekitar 30<sup>0</sup>C, konsentrasi dari garam yang tidak terlalu tinggi, serta pasokan air yang berlimpah.

Telur mengendap sebagai kista dan dikelilingi cangkang tebal hingga siap dibuahi, hal ini dapat terjadi selama kondisi diatas tidak dipenuhi. *Artemia salina* bersifat fototaksis positif atau tertarik pada cahaya. *Artemia salina* ke permukaan untuk menuju cahaya dan tenggelam lagi saat tidak terdapat cahaya. Setelah menetas telur akan tenggelam ke bawah karena gravitasi yang disebut dengan perilaku geotaksis positif [29].

## 2.8 Hipotesis

1. Variasi suhu yang diberikan selama proses sintesis berpengaruh terhadap kuantitas hasil sintesis yang didapatkan.
2. Variasi waktu reaksi yang diberikan selama proses sintesis berpengaruh terhadap kuantitas hasil sintesis yang didapatkan.
3. Senyawa organonitrogen yang terbentuk dari hasil sintesis eugenol dan asetonitril yaitu *N-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propanyl]acetamide* atau *6-methoxy-3-methyl-1-substituted 3,4-dihydroisoquinolin-7-ol*.



Halaman ini sengaja dikosongkan



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus hingga bulan Desember 2018 bertempat di Laboratorium Kimia Dasar dan UPT Instrumentasi (analisis hasil reaksi) Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Institut Atsiri (reaksi sintesis) Universitas Brawijaya.

### 3.2 Alat dan bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian diantaranya seperangkat alat gelas, corong pisah, *hot plate stirrer*, *magnetic stirrer* seperangkat alat refluks, baskom, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, Instrumen spektrofotometer UV-Vis (*double beam* Shimadzu 1600 series), Instrumen spektrofotometer IR (Shimadzu 8400), Instrumen *Gas Chromatograph-Mass Spectrometer* (Shimadzu QP2010S), pH universal, aerator, selang, lampu dan tabung.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian diantaranya aquades, larutan eugenol standar (pa), larutan asetonitril (pa), larutan asam sulfat (pa), natrium bikarbonat jenuh, garam dapur, telur *Artemia salina*, air laut, dan dimetil sulfoksida (pa)

### 3.3 Rancangan dan tahapan penelitian

Penelitian ini dirancang berdasarkan metode deskriptif laboratorik, kecuali uji toksisitas dengan metode rancangan lengkap. Adapun tahapan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Persiapan alat dan bahan penelitian.

2. Sintesis organonitrogen dari eugenol dan asetonitril dengan variasi suhu dan waktu reaksi.
3. Karakterisasi dengan spektrofotometri UV-Vis.
4. Karakterisasi dengan spektrofotometri IR.
5. Karakterisasi dengan spektrofotometri GC-MS.
6. Analisis toksisitas menggunakan metode *Brain Shrimp Lethality Test* (BSLT).
7. Analisis data.

### 3.4 Prosedur kerja

#### 3.4.1 Sintesis senyawa organonitrogen dengan variasi suhu

Sebanyak 0,1 mol (16.4 g, 16 mL) eugenol dan 0,5 mol (20.5 g, 26 mL) asetonitril dimasukkan dalam labu alas bulat. Selanjutnya dilakukan pengadukan terhadap campuran dengan *magnetic stirrer* dalam keadaan suhu yang dibuat variasi yaitu suhu es (0°C), suhu ruang (27°C), dan suhu refluks (90°C) lalu ditambahkan secara bertetes-tetes 0,1 mol (9.81 g, 5 mL) asam sulfat. Pengadukan dilakukan dalam waktu 4 jam. Larutan campuran dinetralkan dengan penambahan larutan natrium bikarbonat jenuh hingga pH 7-8. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan corong pisah. Lapisan organik dicuci dengan 50 mL akuades. Senyawa organonitrogen hasil sintesis selanjutnya ditimbang massa produk dan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer IR, dan Spektrometer GC-MS.

#### 3.4.2 Sintesis senyawa organonitrogen dengan variasi waktu

Sebanyak 0,1 mol (16.4 g, 16 mL) eugenol dan 0,5 mol (20.5 g, 26 mL) asetonitril dimasukkan dalam labu alas bulat. Selanjutnya dilakukan pengadukan terhadap campuran dengan *magnetic stirrer* dalam keadaan suhu refluks (90°C) lalu ditambahkan secara bertetes-tetes 0,1 mol (9.81 g, 5 mL) asam sulfat. Pengadukan dilakukan dalam waktu reaksi 8 dan 16 jam. Larutan campuran dinetralkan dengan penambahan larutan natrium bikarbonat jenuh hingga pH 7-8. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan corong pisah. Lapisan

repository.ub.ac.id

organik dicuci dengan 50 mL akuades. Senyawa organonitrogen hasil sintesis selanjutnya ditimbang massa produk dan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer IR, dan Spektrometer GC-MS.

### 3.4.3 Karakterisasi produk reaksi

#### 3.4.3.1 Spektrofotometer UV-Vis

Karakterisasi produk reaksi menggunakan spektrofotometer UV-Vis *double beam* Shimadzu 1600 series dengan dilakukan preparasi larutan blanko yaitu asetonitril untuk membuat *baseline* pada panjang gelombang 200-600 nm. Produk reaksi suhu es (0°C) waktu reaksi 4 jam, suhu ruang (27°C) waktu reaksi 4 jam, dan suhu refluks (90°C) waktu reaksi 4, 8, dan 16 Jam sebagai sampel dimasukkan ke dalam kuvet setebal 1 cm dan alat *dirunning*. Produk reaksi diukur nilai absorbansi serta panjang gelombang maksimum. Hasil yang diperoleh berupa spektra hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang.

#### 3.4.2.2 Spektrofotometer IR

Karakterisasi produk reaksi menggunakan spektrofotometer IR Shimadzu 8400 dengan preparasi sampel. Produk reaksi suhu es (0°C) waktu reaksi 4 jam, suhu ruang (27°C) waktu reaksi 4 jam, dan suhu refluks (90°C) waktu reaksi 4, 8, dan 16 Jam sebagai sampel diteteskan secukupnya pada NaCl *window*. Kedua NaCl *window* ditekan agar tidak ada gelembung pada kedua NaCl *window*. Selanjutnya NaCl *window* yang telah ditetesi sampel diletakkan *sample holder* dalam spektrofotometer IR dan dilakukan *running*. Hasil yang diperoleh berupa spektra hubungan antara transmitansi dengan bilangan gelombang.

#### 3.4.2.3 Spektrofotometer GC-MS

Karakterisasi produk reaksi menggunakan spektrofotometer GC-MS Shimadzu QP2010S yang menggunakan kolom aligent HP 5MS dengan panjang 30 meter. Produk reaksi diinjeksikan kedalam

instrumen spektrofotometer GC-MS. Hasil yang diperoleh berupa spektra untuk mengetahui waktu retensi dan massa suatu molekul. Berikut merupakan kondisi alir selama analisis:

===== Analytical Line 1 =====			===== Analytical Line 1 =====	
[GC-2010]			[GCMS-QP2010]	
Column Oven Temp.	:80.0 °C		IonSourceTemp	:200.00 °C
Injection Temp.	:310.00 °C		Interface Temp.	:300.00 °C
Injection Mode	:Splitless		Solvent Cut Time	:3.00 min
Sampling Time	:1.00 min		Detector Gain Mode	:Relative
Flow Control Mode	:Pressure		Detector Gain	:0.00 kV
Pressure	:20.8 kPa		Threshold	:1000
Total Flow	:41.2 mL/min		[MS Table]	
Column Flow	:0.54 mL/min		--Group 1 - Event 1--	
Linear Velocity	:27.0 cm/sec		Start Time	:3.00min
Purge Flow	:3.0 mL/min		End Time	:30.00min
Split Ratio	:70.0		ACQ Mode	:Scan
High Pressure Injection	:OFF		Event Time	:0.50sec
Carrier Gas Saver	:OFF		Scan Speed	:1250
Oven Temp. Program			Start m/z	:28.00
Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)	End m/z	:600.00
-	80.0	5.00	Sample Inlet Unit	:GC
10.00	310.0	15.00		
< Ready Check Heat Unit >				
Column Oven	: Yes			
SPL1	: Yes			
MS	: Yes			
< Ready Check Detector(FTD) >				
< Ready Check Baseline Drift >				
< Ready Check Injection Flow >				
SPL1 Carrier	: Yes			
SPL1 Purge	: Yes			
< Ready Check APC Flow >				
< Ready Check Detector APC Flow >				
External Wait	:No			
Equilibrium Time	:3.0 min			

**Gambar 3. 1** Kondisi alir selama analisis pada instrumen GC-MS

### 3.4.3 Uji toksisitas menggunakan metode *Brain Shrimp Lethality Test*

#### 3.4.3.1 Penetasan telur larva udang *Artemia salina*

Telur *Artemia salina* sebanyak 0,03 g direndam dengan 1 liter air laut dalam wadah. Wadah diterangi menggunakan lampu 40 watt yang diletakkan di samping wadah untuk memberikan suhu optimal (28<sup>0</sup>C) dalam penetasan. Aerasi diberikan melalui selang yang disambungkan ke aerator. Setelah 48 jam perendaman, telur menetas dan menghasilkan larva yang digunakan untuk pelaksanaan uji.

#### 3.4.3.2 Preparasi larutan uji

repository.ub.ac.id

Senyawa eugenol serta senyawa hasil sintesis dibuat dengan konsentrasi yang bervariasi, yaitu dalam 10, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150. Sebelumnya dibuat larutan induk 500 ppm yang merupakan larutan eugenol yang diencerkan dengan dimetil sulfoksida 1%. Pembuatan larutan eugenol dengan konsentrasi bervariasi berasal dari larutan induk 500 ppm yang ditambahkan dengan dimetil sulfoksida 1%, air laut, dan dikocok hingga larutan homogen.

### 3.4.3.3 Pelaksanaan uji

Masing-masing larutan uji sebanyak 5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan larva udang sebanyak 10 ekor. Larutan dibiarkan selama 24 jam, dan dihitung jumlah larva yang mati dan yang hidup dari tiap tabung reaksi. Persen kematian larva udang *Artemia salina* Leach. dihitung tiap konsentrasi dengan persamaan:

$$\text{Persen mortalitas} = \frac{N_t}{N_o} \times 100\% \quad (3.4)$$

$N_t$  merupakan jumlah larva yang mati setelah perlakuan, dan  $N_o$  merupakan jumlah total larva [24].

### 3.4.4 Analisis data

Data dalam bentuk spektrum UV-Vis digunakan untuk menunjukkan jumlah dari spesi molekul yang dapat menyerap radiasi dengan dihasilkannya nilai panjang gelombang maksimum. Spektrum IR digunakan untuk identifikasi mengenai gugus fungsional yang menyerap radiasi dari IR yang membentuk puncak-puncak. Serta spektrum GC-MS untuk menentukan struktur molekul dari fragmen- fragmen ion yang terbentuk. Sedangkan uji toksisitas untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  dari sampel hasil sintesis melalui kurva hubungan antara konsentrasi dengan mortalitas agar didapatkan regresi linear agar dapat diketahui potensi sampel hasil sintesis sebagai senyawa obat. Penentuan Nilai  $LC_{50}$  secara online [30] melalui persamaan *four parameter logistic equation* yang sesuai dengan kurva dosis-respon dengan kemiringan slope variabel.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Sintesis organonitrogen dari eugenol dan asetoni-tril dengan variasi suhu dan waktu reaksi

Sintesis senyawa organonitrogen melalui reaksi Ritter ini menggunakan *starting material* eugenol murni. Reaksi Ritter terjadi antara senyawa eugenol yang berperan sebagai prekursor karbokation dengan senyawa asetoni-tril yang merupakan senyawa nitril, dan penambahan katalis asam kuat yaitu  $H_2SO_4$  untuk membentuk senyawa organonitrogen. Perbandingan antara Eugenol: Asetoni-tril:  $H_2SO_4$  yang digunakan selama reaksi berturut-turut sebesar 0,1: 0,5: 0,1 mol. Asetoni-tril dalam reaksi dibuat berlebih dimaksudkan agar diperoleh hasil atau yield dalam jumlah yang besar.

Selama preparasi, katalis  $H_2SO_4$  ditambahkan setetes demi setetes dalam eugenol dan asetoni-tril yang terlebih dahulu dicampur dan diaduk dengan *stirrer*. Penambahan katalis setetes demi setetes tersebut dimaksudkan untuk menghindari perubahan panas secara ekstrim saat penambahan katalis yang bersifat eksoterm atau melepas panas ke lingkungan. Selanjutnya dilakukan proses pengadukan dengan *magnetic stirrer* agar reaksi berlangsung dengan maksimal.

Setelah reaksi berjalan, larutan didinginkan dan dilanjutkan dengan pengukuran pH. Larutan hasil reaksi dinetralkan dengan penambahan larutan natrium bikarbonat jenuh hingga pH mencapai 7. Selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan corong pisah, untuk didapatkan fasa organik. Fasa organik yang didapat ditempatkan dalam corong pisah dan dicuci dengan air untuk didapatkan produk reaksi.

Reaksi dilakukan selama 4 jam dengan suhu selama proses reaksi dibuat bervariasi, yaitu pada suhu es ( $0^\circ C$ ), suhu ruang ( $27^\circ C$ ), dan suhu refluks ( $90^\circ C$ ). Setelah reaksi pada suhu es ( $0^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam didapatkan larutan dengan massa 15,82g berwarna jingga, suhu ruang ( $27^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam didapatkan larutan dengan massa 16,31g berwarna jingga kecoklatan, dan suhu refluks ( $90^\circ C$ ) dengan waktu reaksi 4 jam 12,60 (2%) berwarna coklat serta lebih berminyak. Hasil yang didapatkan

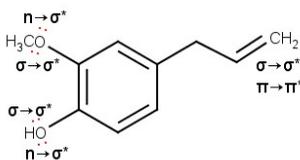
selanjutnya dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri IR, dan spektrofotometri GC-MS.

Selain suhu reaksi yang dibuat bervariasi, dilakukan juga variasi terhadap waktu reaksi. Variasi waktu dilakukan pada kondisi suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 8 jam dan 16 jam. Setelah reaksi selama 8 jam didapatkan larutan dengan massa sebesar 11,41 g (7%) berwarna coklat gelap serta berminyak. Sedangkan hasil yang diperoleh dari proses sintesis selama 16 jam yaitu, larutan dengan massa 8,36 g (11%) berwarna coklat dan berminyak. Hasil reaksi yang didapatkan selanjutnya dikarakterisasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri IR, dan spektrofotometri GC-MS.

Hasil yang diperoleh dari sintesis dengan menggunakan eugenol: asetonitril sebesar 0,1 mol: 0,5 mol lebih besar dibandingkan dengan penelitian yang sebelumnya telah dilakukan Shklyayev, dkk., dengan menggunakan perbandingan eugenol:asetonitril selama reaksi 0,02 mol:0,02 mol dengan produk reaksi yang terbentuk 1,3 g [4].

## 4.2 Karakterisasi dengan spektrofotometri UV-Vis

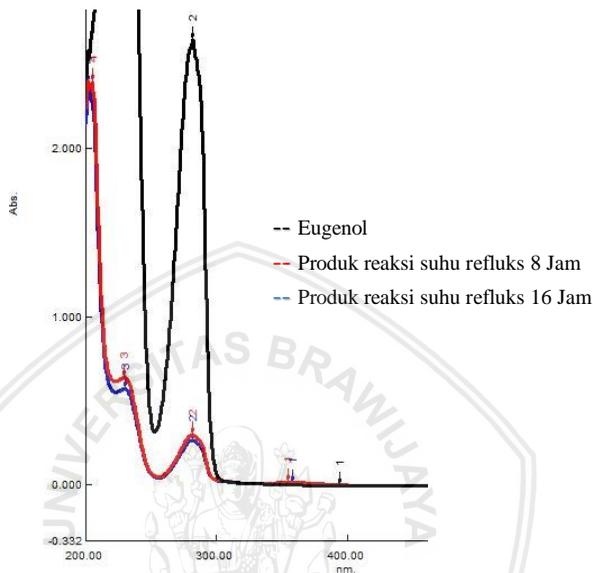
Produk sintesis yang didapatkan dikarakterisasi salah satunya menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui gugus fungsional yang terdapat dalam produk. Eugenol sebagai standart dianalisis dengan rentang panjang gelombang 200-600 nm. Selanjutnya produk reaksi dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ), suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ), dan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dianalisis dalam rentang panjang gelombang 200-600 nm. Berdasarkan hasil analisis didapatkan ketiga produk sintesis memiliki serapan yang mirip dengan eugenol sebagai standart dapat dimungkinkan jika larutan setelah sintesis yang didapatkan masih dalam bentuk *starting material*.



**Gambar 4. 1.** Transisi elektron yang terjadi dalam senyawa eugenol

repository.ub.ac.id

Hasil sintesis dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ), suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ), dan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) memiliki panjang gelombang maksimum pada 282 nm berdasarkan transisi elektron yang terjadi yaitu  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Hal ini karena beberapa transisi elektron yang terjadi *forbidden* akibat  $\sigma$  tidak muncul di daerah visibel.

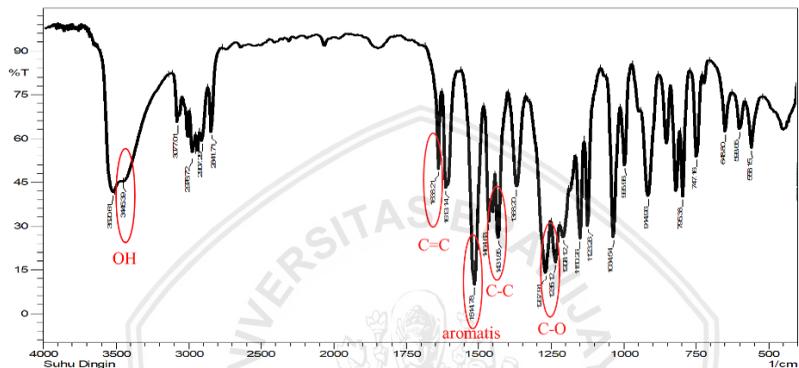


**Gambar 4. 2** Spektrum UV-Vis dari eugenol dan hasil reaksi

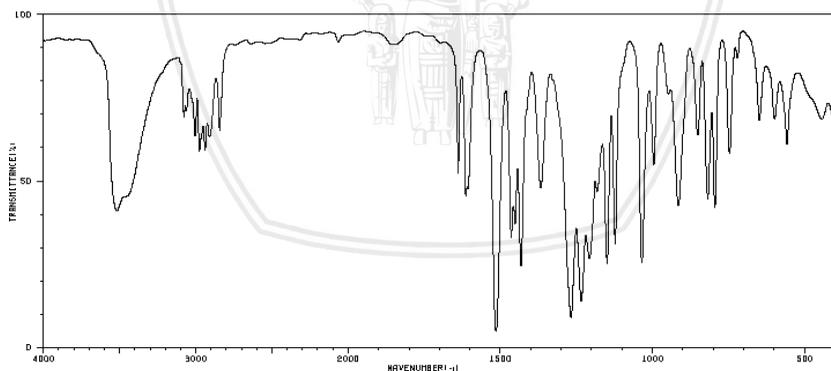
Analisis untuk produk reaksi suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan variasi waktu 8 dan 16 jam memiliki serapan yang berbeda dari produk reaksi sebelumnya. Serapan dari produk reaksi 8 jam dan 16 jam berturut-turut memiliki panjang gelombang maksimum 280 nm dan 281.50 nm dan menunjukkan serapan yang lebih rendah dibanding serapan produk reaksi dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ), suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ), dan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ). Serapan dari produk reaksi 8 jam dan 16 jam turun dapat diakibatkan karena adanya kandungan komponen lain yang lebih mendominasi daripada komponen eugenol. Selain itu, terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih kecil atau biasa disebut dengan pergeseran biru atau hipsokromik. Pergeseran tersebut dapat diakibatkan karena adanya gugus auksokrom ataupun karena penambahan pelarut.

### 4.3 Karakterisasi dengan spektrofotometri IR

Produk reaksi yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer IR dengan tujuan mengetahui gugus-gugus fungsional yang terdapat dalam produk reaksi ditunjukkan dengan serapan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisis terhadap produk reaksi dari suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ) didapatkan spektrum IR seperti Gambar 4.3.



Gambar 4. 3 Spektrum IR hasil reaksi pada suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ )

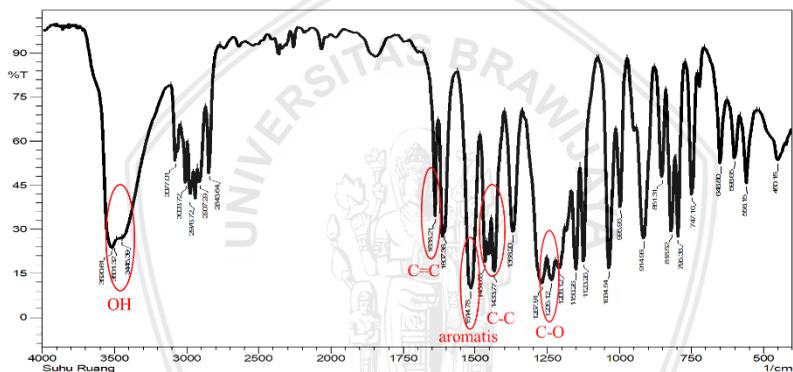


Gambar 4. 4 Spektrum IR senyawa eugenol standart

Pita serapan yang muncul dari spektrum memiliki kesamaan dengan spektrum eugenol yang terdapat pada Gambar 4.4 [31]. Pita serapan muncul pada bilangan gelombang  $3445.39\text{ cm}^{-1}$  dari regangan O-H

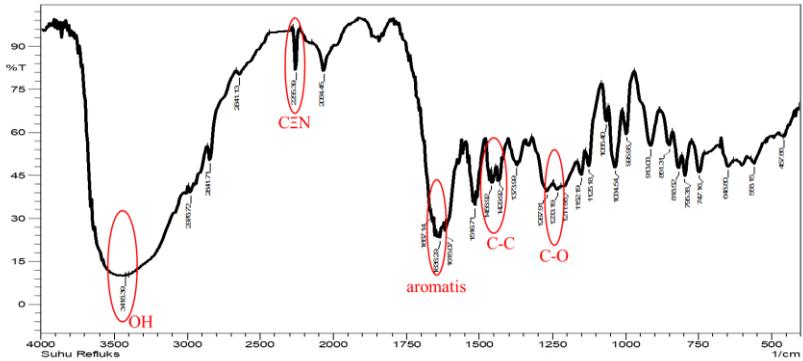
*stretching*. Selain itu terdapat pita serapan pada bilangan gelombang 1638.21  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C=C *stretching*, bilangan gelombang 1431.85  $\text{cm}^{-1}$  dan 1464.63  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-C dalam cincin *stretching*, 1514.76  $\text{cm}^{-1}$  dan 1613.14  $\text{cm}^{-1}$  dari senyawa aromatis *stretching*, dan 1235.12  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-O *stretching*.

Berdasarkan hasil analisis terhadap produk reaksi dari suhu ruang ( $27^\circ\text{C}$ ) didapatkan spektrum IR seperti Gambar 4.5. Pita serapan muncul pada bilangan gelombang 3445.39  $\text{cm}^{-1}$  serta 3501.32  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan O-H *stretching*. Selain itu terdapat pita serapan pada bilangan gelombang 1638.21  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C=C *stretching*, bilangan gelombang 1433.77  $\text{cm}^{-1}$  dan 1464.63  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-C *stretching* dalam cincin, 1514.78  $\text{cm}^{-1}$  dan 1607.36  $\text{cm}^{-1}$  dari senyawa aromatis *stretching*, dan 1235.12  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-O *stretching*.



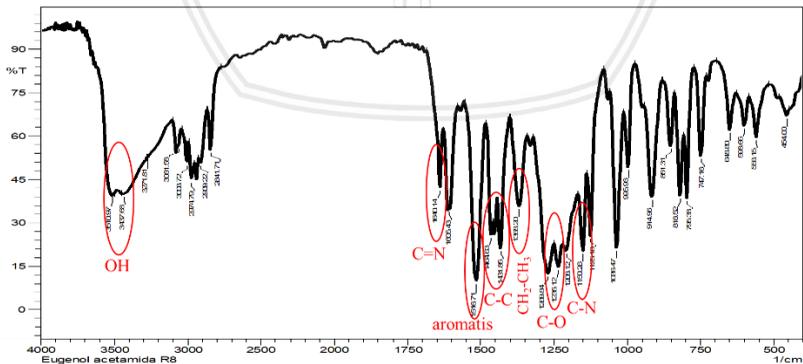
**Gambar 4.5** Spektrum IR hasil reaksi pada suhu ruang ( $27^\circ\text{C}$ )

Analisis terhadap produk reaksi dari suhu refluks ( $90^\circ\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 4 jam didapatkan spektrum IR seperti Gambar 4.6. Pita serapan muncul pada bilangan gelombang 1636.29  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C=O *stretching*. Selain itu terdapat pita serapan pada bilangan gelombang 3418.39  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan O-H *stretching*, bilangan gelombang 2255.39  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C≡N *stretching*, 1429.92  $\text{cm}^{-1}$  dan 1456.92  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-C *stretching* dalam cincin, 1516.71  $\text{cm}^{-1}$  dan 1615.07  $\text{cm}^{-1}$  dari senyawa aromatis *stretching*, dan 1233.19  $\text{cm}^{-1}$  dari regangan C-O *stretching*.



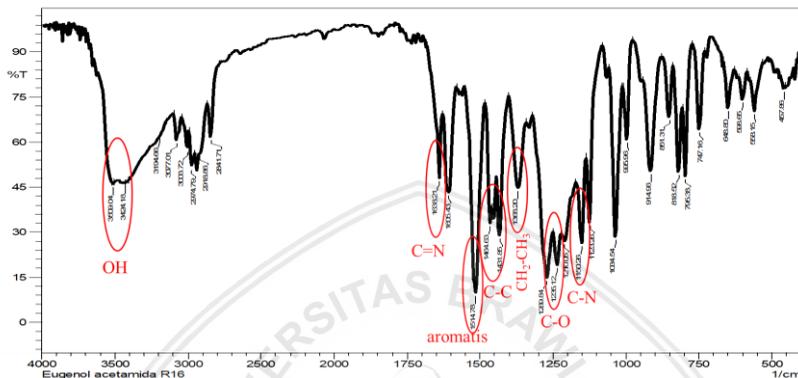
**Gambar 4. 6** Spektrum IR hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 4 jam

Analisis yang telah dilakukan terhadap produk reaksi dari variasi waktu 8 jam didapatkan spektrum IR seperti Gambar 4.7. Spektrum IR dapat diinterpretasikan bahwa terdapat serapan imina. Serapan khas ditandai dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang  $1640.14\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}=\text{N}$  *stretching* dalam cincin,  $1150.26\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{N}$  *stretching*. Selain itu terdapat pita serapan pada bilangan gelombang  $1431.85\text{ cm}^{-1}$  dan  $1464.63\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{C}$  *stretching* dalam cincin,  $1516.71\text{ cm}^{-1}$  dan  $1605.43\text{ cm}^{-1}$  dari senyawa aromatis *stretching*,  $1368.20\text{ cm}^{-1}$  dari ikatan  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$  *bending*,  $3437.68\text{ cm}^{-1}$  dan  $3510.97\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{O}-\text{H}$  *stretching*, dan  $1235.12\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{O}$  *stretching*.



**Gambar 4. 7** Spektrum IR hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 8 jam

Spektrum IR yang didapatkan dari analisis terhadap produk reaksi dari variasi waktu 16 jam (Gambar 4.8) tidak berbeda jauh dengan spektrum IR produk waktu reaksi 8 jam. Spektrum IR dapat diinterpretasikan bahwa terdapat serapan imina.



**Gambar 4. 8** Spektrum IR hasil reaksi suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 16 jam

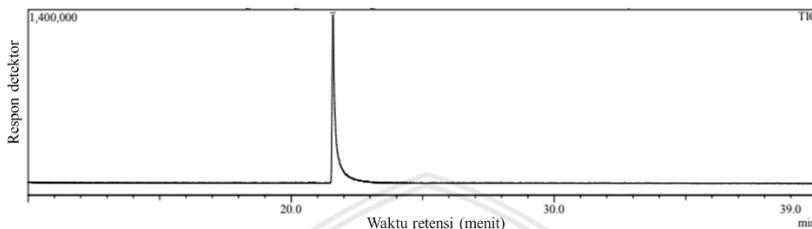
Serapan khas ditandai dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang  $1638.21\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}=\text{N}$  *stretching* dalam cincin,  $1150.26\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{N}$  *stretching*. Selain itu terdapat pita serapan pada bilangan gelombang  $1431.85\text{ cm}^{-1}$  dan  $1464.63\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{C}$  *stretching* dalam cincin,  $1514.76\text{ cm}^{-1}$  dan  $1605.43\text{ cm}^{-1}$  dari senyawa aromatis *stretching*,  $1368.20\text{ cm}^{-1}$  dari ikatan  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$  *bending*,  $3424.18\text{ cm}^{-1}$  dan  $3509.04\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{O}-\text{H}$  *stretching*, dan  $1235.12\text{ cm}^{-1}$  dari regangan  $\text{C}-\text{O}$  *stretching*.

#### 4.4 Karakterisasi dengan spektrofotometri GC-MS

Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer IR dapat digunakan untuk mendukung hasil analisis larutan yang dihasilkan dari sintesis yang dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer GC-MS. Hasil spektrum IR menunjukkan jika pada

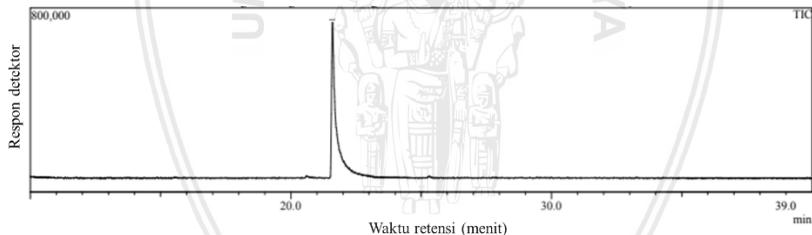
repository.ub.ac.id

suhu reaksi ( $0^{\circ}\text{C}$ ) dan suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ) larutan yang terbentuk setelah proses sintesis adalah *starting material* yaitu eugenol. Hal tersebut didukung dengan kromatogram hasil dari karakterisasi produk reaksi pada suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ) yang menunjukkan adanya satu komponen dengan kadar relatif mencapai 100%. Puncak yang muncul pada waktu retensi 21,588 dengan area 10379919 merupakan senyawa eugenol (Gambar 4.9).



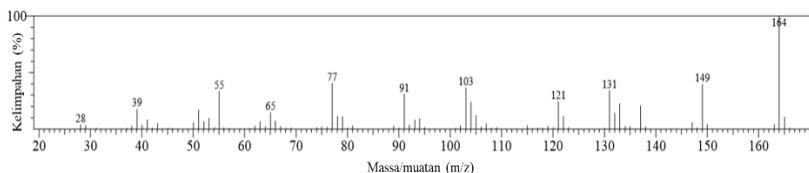
**Gambar 4. 9** Kromatogram hasil reaksi pada suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ )

Hal yang sama juga ditunjukkan kromatogram dari karakterisasi produk reaksi pada suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ) dengan munculnya satu puncak pada waktu retensi 21,595 dengan area 5972356 dan kadar relatif mencapai 100% (Gambar 4.10).



**Gambar 4. 10** Kromatogram hasil reaksi pada suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ )

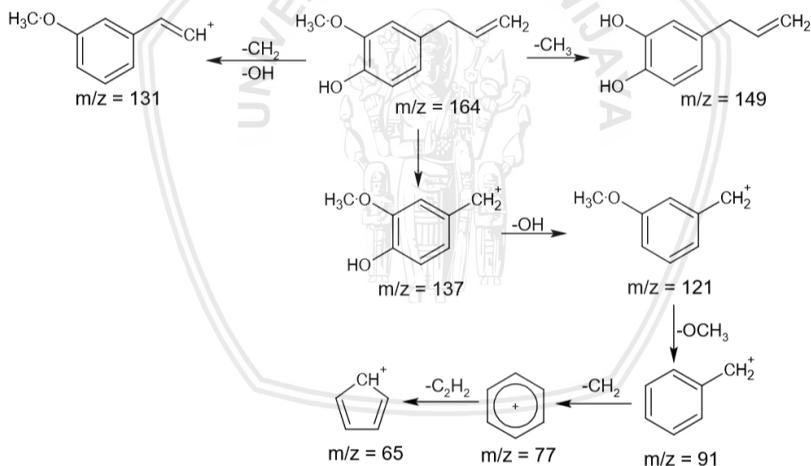
Puncak yang muncul tersebut diduga merupakan senyawa eugenol berdasarkan dari spektrum massa yang didapatkan (Gambar 4.11).



**Gambar 4. 11** Spektrum massa hasil reaksi pada suhu es ( $0^{\circ}\text{C}$ ) dan suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ) sesuai dengan puncak  $t_{\text{R}} = 21,588$ .

Spektrum massa menunjukkan jika  $M^+$   $m/z$  164 dari puncak tertinggi dengan waktu retensi 21,588. Nilai tersebut menunjukkan jika berat molekul senyawa yang dianalisis adalah 164 bersesuaian dengan berat molekul eugenol dengan pola fragmentasi yang disarankan seperti pada Gambar 4.12.

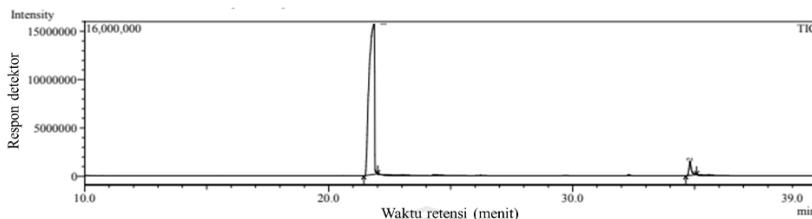
Base peak  $M^+$   $m/z$  164 ditembak menggunakan elektron yang berenergi tinggi sehingga membuatnya terpecah membentuk ion dengan puncak  $m/z$  149 akibat kehilangan ion  $-\text{CH}_3$ , membentuk puncak  $m/z$  131 dengan kehilangan ion  $-\text{CH}_3$  dan  $-\text{OH}$  atau membentuk puncak  $m/z$  137 dengan melepas  $-\text{CH}_2=\text{CH}$ , yang selanjutnya terbelah kembali menjadi puncak  $m/z$  121 dengan melepas  $-\text{OH}$ . Puncak  $m/z$  121 kehilangan ion  $-\text{OCH}_2$  dan membentuk ion dengan puncak  $m/z$  91 yang dapat terbelah kembali menjadi puncak  $m/z$  77 dengan melepas ion  $-\text{CH}_2$  atau menjadi puncak  $m/z$  65 dengan melepas ion  $-\text{C}_2\text{H}_2$ .



**Gambar 4. 12** Pola fragmentasi dari senyawa eugenol

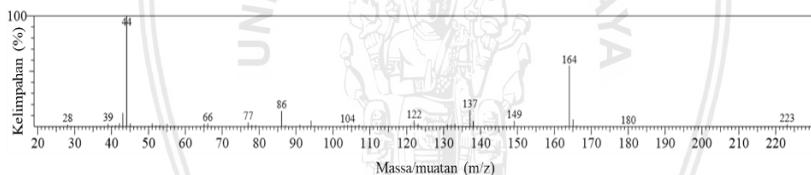
Analisis yang sebelumnya dilakukan menggunakan instrumen IR terhadap hasil reaksi dari suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 4 jam diketahui jika terbentuk serapan khas yang mendominasi adalah serapan dengan gugus  $\text{C}=\text{O}$ . Hasil analisis tersebut didukung dengan kromatogram dari hasil reaksi pada suhu

refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 4 jam yang menunjukkan adanya dua komponen, komponen pertama dengan area 237793210 serta kadar relatif 96,06% dan komponen kedua dengan area 9761181 serta kadar relatif 3,94%. Puncak pertama muncul pada waktu retensi 21,864 yang berdasarkan spektrum massa merupakan senyawa eugenol (Gambar 4.13).



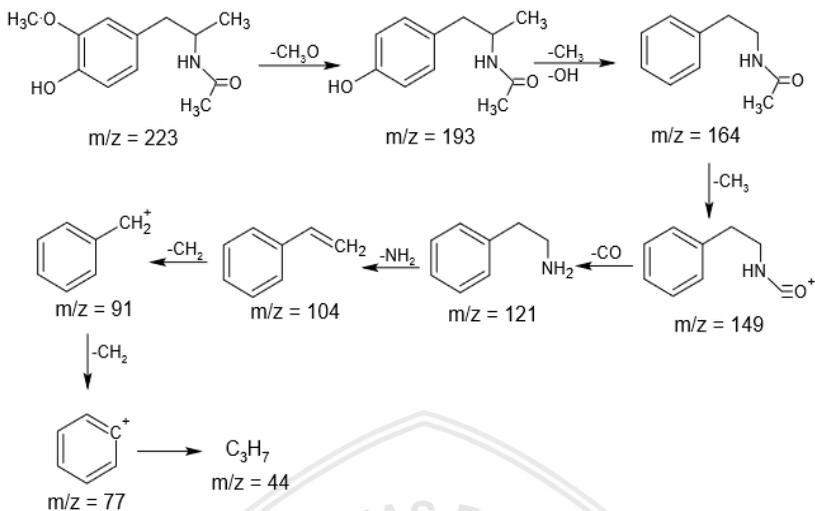
**Gambar 4. 13** Kromatogram hasil reaksi dari suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ )

Puncak kedua pada waktu retensi 34,809 diketahui sebagai senyawa eugenil asetat dari spektrum massa yang dihasilkan. Puncak  $m/z$  223 menunjukkan jika berat molekul senyawa yang dianalisis adalah 233 bersesuaian dengan berat molekul senyawa eugenil asetat.



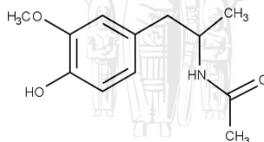
**Gambar 4. 14** Spektrum massa hasil reaksi dari pada refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) sesuai dengan puncak kedua  $t_R = 21,864$

Puncak  $m/z$  223 yang dikenai elektron dengan energi tinggi terpecah menjadi puncak  $m/z$  193 dengan melepas ion  $-\text{CH}_3\text{O}$  dan menjadi puncak  $m/z$  164 dengan melepas ion  $-\text{CH}_3$  dan ion  $\text{OH}$ . Puncak  $m/z$  164 terpecah menjadi puncak  $m/z$  149 dengan melepas ion  $-\text{CH}_3$  yang selanjutnya terpecah menjadi puncak  $m/z$  121 dengan melepas ion  $-\text{CO}$ . Puncak  $m/z$  121 terbelah menjadi puncak  $m/z$  104 dengan melepas ion  $-\text{NH}_2$ . Puncak  $m/z$  91 terpecah menjadi puncak  $m/z$  77 dengan melepas ion  $-\text{CH}_2$  dan membentuk ion  $\text{C}_3\text{H}_7$ . Berikut merupakan pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa asetat dengan *base peak* pada  $m/z$  44:



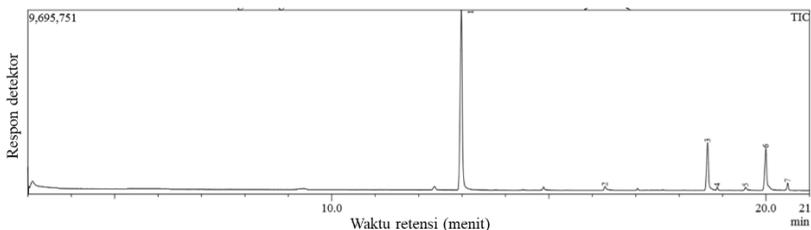
**Gambar 4. 15** Pola fragmentasi senyawa eugenil asetamida

Berdasarkan pola fragmentasi diatas dapat diduga senyawa eugenil asetamida yang terbentuk selama proses sintesis pada suhu refluks ( $90^{\circ}C$ ) dengan waktu reaksi 8 jam merupakan senyawa *N*-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl]acetamide dengan struktur sebagai berikut:



**Gambar 4. 16** Struktur *N*-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl]acetamide

Analisis menggunakan instrumen IR terhadap hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}C$ ) dengan waktu reaksi 8 jam menunjukkan jika terbentuk serapan khas dari gugus imina pada spektrum terhasil. Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat didukung dengan kromatogram dari hasil reaksi suhu refluks ( $90^{\circ}C$ ) waktu reaksi 8 jam (Gambar 4.17) yang menunjukkan jika terdapat tujuh komponen yang terdeteksi dalam hasil sintesis (Tabel 1).



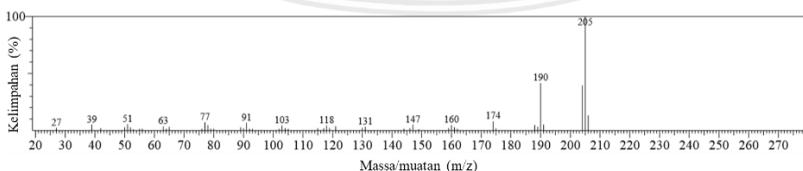
**Gambar 4. 17** Kromatogram hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 8 jam

Kromatogram (Gambar 4.17) menunjukkan jika senyawa yang terdeteksi pada waktu retensi 12,984 dengan area 32917590 merupakan eugenol.

**Tabel 4. 1** Komponen dari hasil reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 8 jam

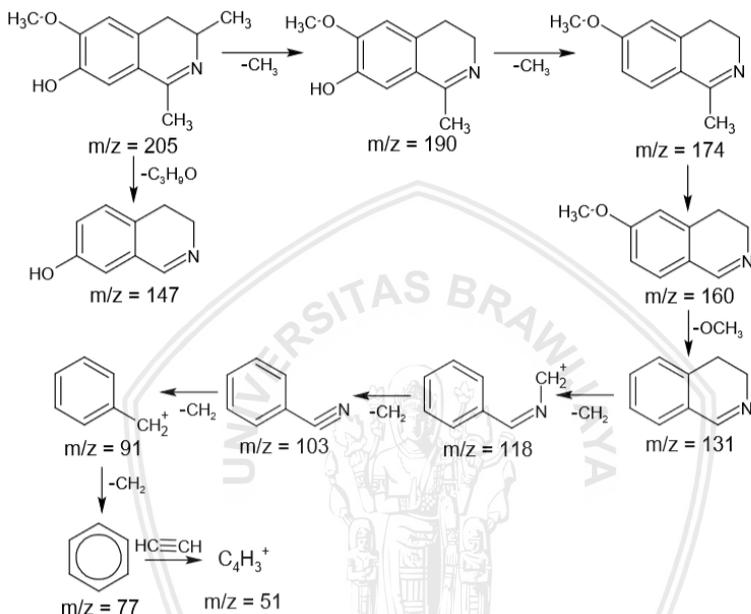
Peak	Waktu retensi (menit)	Area	% Area
1	12,984	32917590	67,76
2	16,292	481705	0,99
3	18,657	6241124	12,85
4	18,877	267612	0,55
5	19,533	327968	0,68
6	19,998	7499160	15,44
7	20,503	842620	1,73

Hal ini dapat diketahui dari spektrum massa puncak pertama dengan *base peak*  $\text{M}^+$   $m/z$  164 yang bersesuaian dengan berat molekul eugenol.



**Gambar 4. 18** Spektrum massa produk reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) waktu reaksi 8 jam sesuai dengan puncak  $t_R = 18,657$

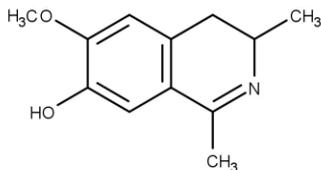
Senyawa yang muncul pada puncak ketiga dengan area 6241124 serta waktu retensi 18,657 diduga sebagai senyawa isoquinolina. Hal tersebut berdasarkan spektrum massa dengan *base peak*  $M^+$   $m/z$  205 yang bersesuaian dengan berat molekul isoquinolina. Berikut merupakan pola fragmentasi yang dimungkinkan untuk senyawa isoquinolina:



**Gambar 4. 19** Pola fragmentasi dari senyawa isoquinolina.

Spektrum massa dari senyawa isoquinolina menunjukkan  $M^+$   $m/z$  205 yang berarti senyawa tersebut memiliki berat molekul 205 yang bersesuaian dengan berat molekul dari isoquinolina. Puncak  $m/z$  205 akan terlepas saat ditembak dengan elektron dengan energi yang kuat menjadi ion dengan puncak  $m/z$  147 dengan kehilangan -C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O dan puncak  $m/z$  190 melalui terlepasnya ion -CH<sub>3</sub>. Puncak  $m/z$  190 melepas ion -CH<sub>3</sub> dengan terbentuk puncak  $m/z$  174. Puncak  $m/z$  174 terpecah menjadi puncak  $m/z$  160 dengan terlepasnya ion -CH<sub>3</sub>. Puncak  $m/z$  160 terurai menjadi puncak  $m/z$  131 dengan terlepasnya ion -OCH<sub>3</sub>. Ion -CH<sub>2</sub> terlepas sehingga terbentuk puncak  $m/z$  118. Puncak  $m/z$  118 terurai lebih lanjut hingga menjadi puncak

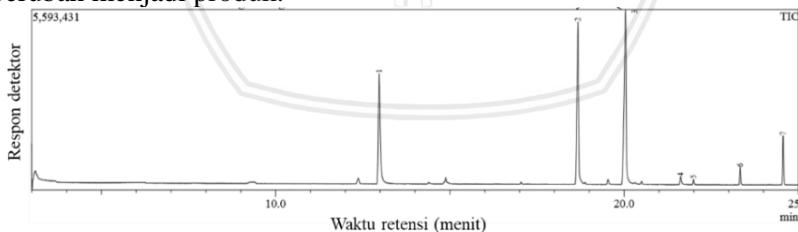
m/z 103, m/z 91, m/z 77, dan m/z 51 (Gambar 4.19). Berdasarkan pola fragmentasi diatas dapat diduga senyawa isoquinolina yang terbentuk merupakan senyawa (6-methoxy-1,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-7-ol) yang memiliki struktur sebagai berikut:



**Gambar 4. 20** Struktur dari senyawa isoquinolina (*6-methoxy-1,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-7-ol*)

Senyawa yang terdeteksi muncul pada puncak keenam dengan waktu retensi 19,998 dengan area 7499160 diduga sebagai senyawa eugenil asetamida berdasarkan spektrum massa yang dihasilkan. Puncak m/z 223 menunjukkan jika berat molekul senyawa yang dianalisis adalah 233 bersesuaian dengan berat molekul dari senyawa eugenil asetamida, yaitu senyawa *N-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl]acetamide*.

Berdasarkan area yang dihasilkan dari masing-masing puncak menunjukkan jika terjadi penurunan area dari eugenol dan terdapat peningkatan area pada senyawa eugenil asetamida. Selain itu muncul puncak isoquinolina pada kromatogram dengan area yang cukup luas yaitu sebesar 6241124. Hal tersebut dapat diartikan jika eugenol yang merupakan *starting material* yang digunakan dalam sintesis berubah menjadi produk.



**Gambar 4. 21** Kromatogram hasil reaksi produk pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 16 jam

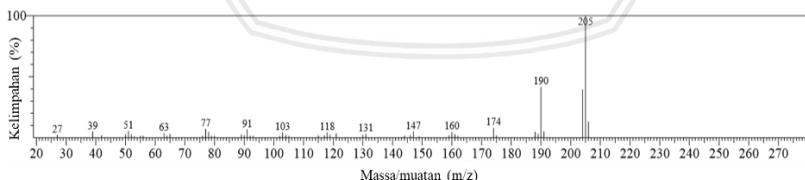
Analisis menggunakan instrumen IR terhadap produk reaksi pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) dengan waktu reaksi 16 jam diketahui jika

terbentuk serapan khas dari gugus imina. Hal tersebut didukung dengan kromatogram (Gambar 4.21) yang menunjukkan adanya delapan senyawa (Tabel 4.2) dalam hasil sintesis pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 16 jam.

**Tabel 4. 2** Komponen dari hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) dengan waktu reaksi 16 jam

Peak	Waktu retensi (menit)	Area	% Area
1	12,972	12473795	19,85
2	18,675	16943559	26,96
3	20,039	21501280	34,21
4	21,622	423126	0,67
5	21,990	254451	0,40
6	23,330	885461	1,41
7	24,608	2978290	4,74
8	25,458	7385543	11,75

Senyawa yang terdeteksi pada puncak pertama waktu retensi 12,972 dengan area 12473795 merupakan eugenol. Hal ini dapat diketahui dari spektrum massa puncak pertama dengan *base peak*  $M^+$   $m/z$  164 yang bersesuaian dengan berat molekul eugenol. Senyawa yang muncul pada puncak kedua waktu retensi 18,675 dengan 16943559 diduga sebagai senyawa isoquinolina. Spektrum massa dari senyawa isoquinolina menunjukkan  $M^+$   $m/z$  205 yang berarti senyawa tersebut memiliki berat molekul 205 yang bersesuaian dengan berat molekul dari isoquinolina, yaitu senyawa *6-methoxy-1,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-7-ol*.



**Gambar 4. 22** Spektrum massa hasil reaksi pada suhu refluks (90°C) waktu reaksi 16 jam sesuai dengan puncak  $t_R = 18,675$

Puncak  $m/z$  205 akan terlepas saat ditembak dengan elektron dengan energi yang kuat menjadi ion dengan puncak  $m/z$  147 dengan

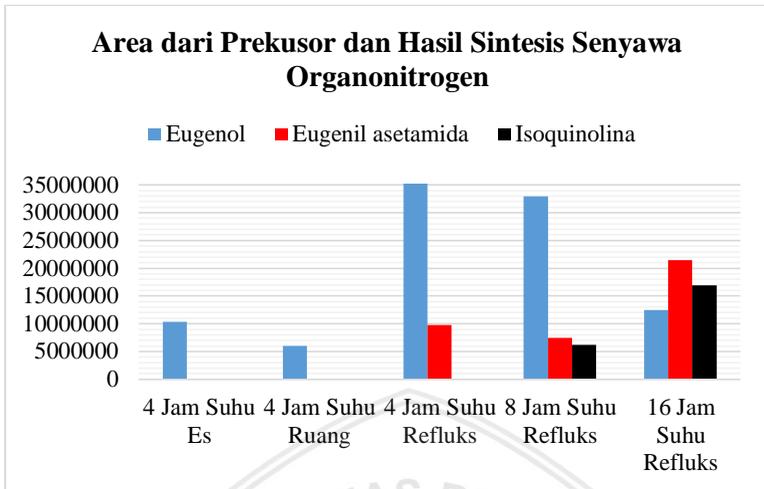
kehilangan  $-C_3H_8O$  dan puncak  $m/z$  190 melalui terlepasnya ion  $-CH_3$ . Puncak  $m/z$  190 melepas ion  $-CH_3$  dengan terbentuk puncak  $m/z$  174. Puncak  $m/z$  174 terpecah menjadi puncak  $m/z$  160 dengan terlepasnya ion  $-CH_3$ . Puncak  $m/z$  160 terurai menjadi puncak  $m/z$  131 dengan terlepasnya ion  $-OCH_3$ . Ion  $-CH_2$  terlepas sehingga terbentuk puncak  $m/z$  118. Puncak  $m/z$  118 terurai lebih lanjut hingga menjadi puncak  $m/z$  103,  $m/z$  91,  $m/z$  77, dan  $m/z$  51 (Gambar 4.19).

Puncak ketiga waktu retensi 20,039 dengan area 21501280 merupakan senyawa eugenil asetamida berdasarkan spektrum massa yang dihasilkan. Puncak  $m/z$  223 menunjukkan jika berat molekul senyawa yang dianalisis adalah 233 bersesuaian dengan berat molekul dari senyawa eugenil asetamida, yaitu senyawa *N*-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propanyl]acetamide.

**Tabel 4. 3** Hasil analisis GC-MS

Senyawa	Waktu reaksi (jam)	Suhu ( $^{\circ}C$ )	Rt	m/z	Base peak	Area
Eugenol	4	0	21,588	164	164	10379919
	4	27	21,595	164	164	5972356
	4	90	21,864	164	164	237793210
	8	90	12,984	164	164	32917590
	16	90	12,972	164	164	12473795
Eugenil asetamida	4	90	34,809	223	44	9761181
	8	90	19,998	223	44	7499160
	16	90	20,039	223	44	21501280
Isoquinolina	8	90	18,657	205	205	6241124
	16	90	18,675	205	205	16943559

Area yang dihasilkan dari masing-masing puncak dari kromatogram menunjukkan jika terjadi penurunan area dari eugenol sebagai *starting material* dan terjadi peningkatan area dari senyawa eugenil asetamida serta pada area dari senyawa isoquinolina. Hal tersebut dapat diartikan jika, dengan suhu refluks serta semakin lama waktu reaksi semakin banyak eugenol yang berperan sebagai *starting material* berubah menjadi produk selama proses sintesis.



**Gambar 4. 23** Grafik area dari prekursor dan hasil sintesis senyawa organonitrogen

Berdasarkan analisis menggunakan UV-Vis, IR, dan GC-MS dapat diketahui jika dengan kondisi reaksi menggunakan suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) selama 16 jam, produk reaksi yang dihasilkan lebih banyak daripada reaksi dengan waktu 8 jam, 4 jam, maupun reaksi pada suhu dingin ( $0^{\circ}\text{C}$ ) maupun suhu ruang ( $27^{\circ}\text{C}$ ). Hal ini ditandai dengan puncak dari eugenol yang semakin rendah, diikuti dengan semakin tingginya puncak dari produk reaksi yaitu senyawa isoquinolina (*6-methoxy-1,3-dimethyl-3,4-dihydroisoquinoline-7-ol*) dan senyawa eugenil asetamida, (*N-[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propyl]acetamide*) yang terdeteksi dan muncul pada kromatogram.

Menurut Rahman, dkk., [7] produk reaksi yang dihasilkan melalui reaksi Ritter dapat diperoleh dengan jumlah yang besar saat energi aktivasi terpenuhi. Reaksi yang berlangsung pada suhu refluks dapat memenuhi tercapainya energi aktivasi yang merupakan syarat termodinamik agar suatu reaktan dapat menjadi produk. Selain itu, semakin bertambahnya waktu reaksi suatu produk akan mengalami kestabilan. Hal ini membuat produk yang berasal dari intermediet yang lebih stabil akan meningkat kuantitasnya pada waktu reaksi yang lebih lama [8]. Reaksi berubahnya reaktan menjadi produk

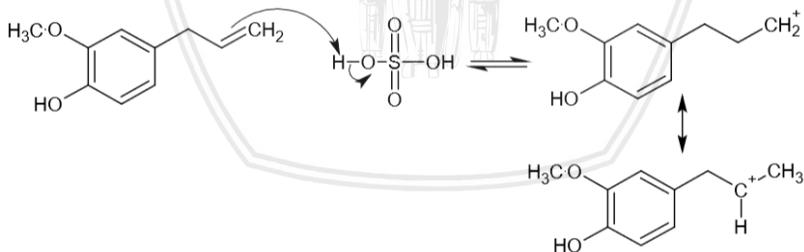
melalui kondisi optimum. Suatu produk akan terbentuk dan meningkat secara teratur hingga mencapai temperatur optimumnya.

Senyawa eugenil asetamida memiliki dua heteroatom, yaitu N dan O. Sedangkan isoquinolina memiliki satu heteroatom yaitu N, hal ini membuat senyawa isoquinolina lebih stabil dibandingkan senyawa eugenil asetamida. Senyawa dengan dua heteroatom memiliki peran sebagai zat antara atau intermediet dalam reaksi. Senyawa eugenil asetamida yang terbentuk pada suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) selama 16 jam lebih banyak dibandingkan isoquinolina. Hal ini dapat disebabkan karena eugenil asetamida merupakan produk intermediet yang stabil sehingga diperlukan energi yang cukup untuk membuat eugenil asetamida menjadi senyawa isoquinolina. Waktu reaksi yang diberikan belum mampu membuat eugenil asetamida tersiklisasi menjadi senyawa isoquinolina.

Mekanisme reaksi dari pembentukan produk senyawa organonitrogen melalui beberapa tahapan. Berikut tahapan-tahapan pembentukan senyawa organonitrogen:

a. Tahap pembentukan karbokation

Eugenol akan terdehidrasi menjadi karbokation akibat adanya penambahan katalis asam yaitu  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Karbokation yang terbentuk adalah karbokation sekunder yang lebih stabil daripada karbokation primer.

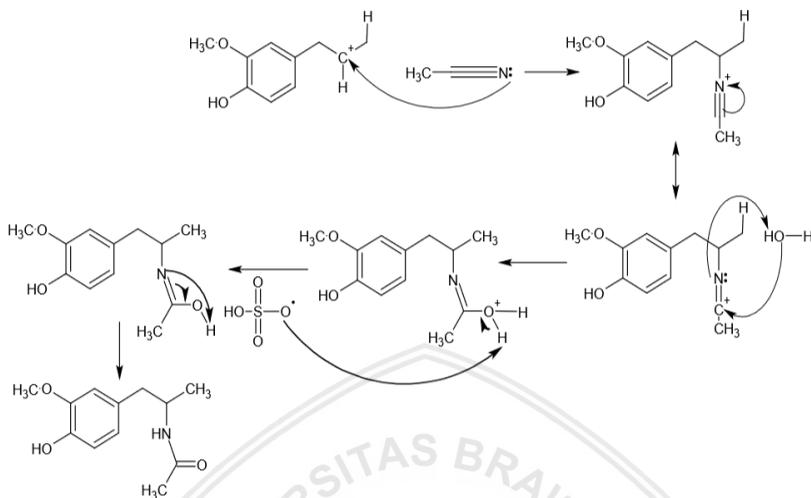


**Gambar 4. 24** Pembentukan karbokation

b. Tahap penyerangan nitril

Tahap ini akan membuat terbentuknya ion nitrilium atau imidate sebagai akibat dari asetonitril yang berperan sebagai

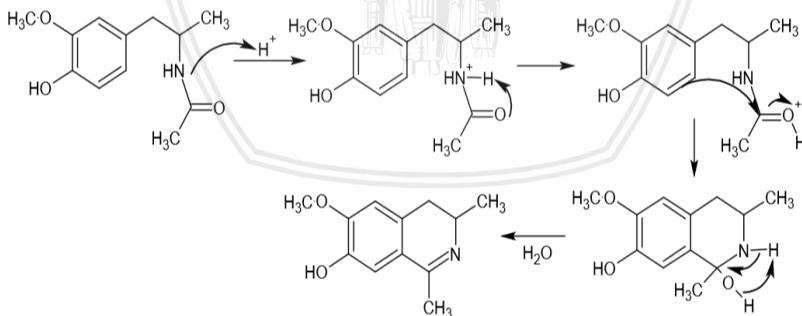
nukleofil yang kaya elektron dan akan menyerang karbokation yang bermuatan positif sehingga terbentuk produk intermediate.



**Gambar 4. 25** Pembentukan ion nitrilium

c. Tahap pembentukan senyawa organonitrogen

Imidate yang terbentuk dari tahap sebelumnya akan terhidrolisis dengan air sehingga membentuk amida.



**Gambar 4. 26** Pembentukan senyawa organonitrogen

#### 4.5 Uji Toksisitas menggunakan metode *Brain Shrimp Lethality Test* terhadap *Artemia salina*

Uji toksisitas dilakukan melalui metode *Brain Shrimp Lethality Test* terhadap larva *Artemia salina*. Metode uji toksisitas digunakan dalam studi farmakologis dalam penentuan sifat toksisitas dari ekstrak tanaman. Metode *Brain Shrimp Lethality Test* terhadap *Artemia salina* memiliki kelebihan diantaranya mudah dalam kultur dengan kondisi fisiologis serta usia organisme yang sama, siklus hidup yang pendek, sensitif, serta biaya yang murah [32].

Pelaksanaan uji toksisitas menggunakan konsentrasi larutan uji 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, dan 150 ppm yang dibuat dari larutan induk 500 ppm yang diencerkan dengan air laut serta penambahan larutan DMSO 1% dari total larutan. Penambahan larutan DMSO ini bertujuan untuk melarutkan larutan uji dalam air laut. Selain itu, digunakan juga larutan dengan konsentrasi 0 ppm sebagai larutan kontrol untuk mengetahui pengaruh yang ditimbulkan dengan adanya penambahan larutan DMSO pada larutan uji terhadap tingkat kematian dari *Artemia salina*. Uji toksisitas dilakukan dengan tiga kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. Larutan uji diambil 5 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial untuk diujikan pada *Artemia salina*.

*Artemia salina* yang digunakan dalam uji toksisitas berumur 48 jam, dengan kondisi *Artemia salina* telah memiliki fisik yang sempurna. Masing-masing botol vial diisi dengan 30 ekor *Artemia salina*. Selanjutnya dihitung jumlah *Artemia salina* yang mati setelah perlakuan 24 jam. Pengamatan jumlah *Artemia salina* yang hidup dapat dilakukan dengan bantuan lampu, karena *Artemia salina* yang masih hidup akan bergerak menuju sumber cahaya. Nilai  $LC_{50}$  dapat dihitung dari persen mortalitas.

Persen mortalitas dari larutan uji (Tabel 4.5) disajikan dalam bentuk grafik hubungan terhadap konsentrasi uji dengan satuan ppm (Gambar 5.1 dan Gambar 5.2). Adapun persamaan grafik serta nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan disajikan dalam Tabel 4.6. Konsentrasi dari larutan uji sebanding dengan persen mortalitas dari *Artemia salina*. Larutan uji eugenol memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 27 ppm yang termasuk dalam kategori aktivitas toksisitas kuat. Sedangkan larutan uji hasil sintesis suhu Refluks ( $90^{\circ}C$ ) waktu reaksi 16 jam memiliki

nilai LC<sub>50</sub> sebesar 16 ppm yang juga termasuk dalam kategori aktivitas toksisitas kuat. Hal tersebut ditunjukkan dengan jumlah kematian *Artemia salina* yang besar dalam konsentrasi larutan uji rendah.

**Tabel 4. 4** Nilai mortalitas masing-masing konsentrasi larutan uji

Konsentrasi (ppm)	Mortalitas rata-rata (%)	
	Eugenol	Hasil Sintesis Refluks 16 Jam
0	0	0
10	33	43
25	47	53
50	60	86
75	80	94
100	100	100
125	100	100
150	100	100

Data analisis yang telah didapatkan, selanjutnya dihitung persen mortalitas untuk dibuat kurva hubungan antara dosis (konsentrasi) dalam ppm dengan respon (persen mortalitas). Kurva yang terbentuk dapat menunjukkan persamaan linear, yang selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai LC<sub>50</sub>.

**Tabel 4. 5** Nilai LC<sub>50</sub> dengan metode *Brain Shrimp Lethality Test*

No	Larutan Uji	Persamaan Kurva	Nilai LC <sub>50</sub>
1.	Eugenol	$y = 0,451 + \frac{(284.252 - 0,451)}{1 + \left(\frac{x}{24.594}\right)^{-0.597}}$	27 ppm
2.	Produk suhu refluks (90°C) waktu reaksi 16 Jam	$y = -0,094 + \frac{(37.542 - (-0.094))}{1 + \left(\frac{x}{24.594}\right)^{-0.883}}$	16 ppm

Larutan uji hasil sintesis suhu refluks (90°C) waktu reaksi 16 jam memiliki tingkat toksisitas lebih tinggi dari eugenol. Hal ini

disebabkan karena adanya gugus heteroatom dari senyawa organonitrogen dengan afinitas dan polaritasnya membuat terjadinya mekanisme biokimia sehingga menyebabkan terjadinya interaksi molekuler dalam tubuh. Interaksi yang terjadi membuat organonitrogen memiliki berbagai aktivitas biologis [6]. Larutan uji hasil sintesis suhu refluks ( $90^{\circ}\text{C}$ ) waktu reaksi 16 dapat berpotensi menjadi senyawa obat.





## DAFTAR PUSTAKA

1. Yubernita, & Juniarti. (2011). **Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi sebagai Antioksidan.** *Makara Journal of Science*, 15(1), 48–52.
2. Bustaman, S. (2011). **Potensi Pengembangan Minyak Daun Cengkih sebagai Komoditas Ekspor Maluku.** *Jurnal Litbang Pertanian*, 30(4).
3. Giuliani, F. (2014). **The Composition, Structure, Sources, and Applications of Eugenol.** *Essai*, 12(19), 62–66.
4. Shklyaev, Y. V., Smolyak, A. A., & Gorbunov, A. A. (2011). **Eugenol and its methyl ether in the synthesis of 3-methyl derivatives of 3, 4-dihydroisoquinoline.** *Russian Journal of Organic Chemistry*, 47(2), 239–244.
5. Shklyaev, Y. V., Rozhkova, Y. S., Perevoshchikova, A. N., & Gorbunov, A. A. (2014). **Regioselective synthesis of 1-substituted 6-methoxy-3, 3, 4, 4-tetramethyl-3, 4-dihydroisoquinolines via Ritter reaction.** *Russian Chemical Bulletin*, 63(9), 2087–2091.
6. Rollas, S., & Kucukguzel, G. (2007). **Biological Activities of Hydrazone Derivatives.** *Molecules*, 1910–1939.
7. Rahman, M. F., & Ifitah, E. D. (2006). **The Synthesis of 1,3-Dimethyl 6,7-Dimethoxy-3,4-Dihydroisoquinoline from Methyleneugenol: Application of Ritter Reaction For Directlycyclization.** *Indonesian Journal of Chemistry*, 6(3), 286–291.
8. Fatma, A., Rahman, M. F., & Ulfa, S. M. (2013). **Studi Pengaruh Waktu Reaksi Terhadap Sintesis Senyawa Oraganonitrogen Berbasis  $\alpha$ -pinena melalui Reaksi Ritter.** *Kimia Student Journal*, 2(1), 386–392.
9. Gulcin, I. (2011). **Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure Activity Relationship Study.** *Journal of Medicinal Food*, 14(9), 975–985. doi:10.1089/jmf.2010.0197

10. Mahboub, R. (2014). **Structural Conformational Study of Eugenol Derivatives Using Semiempirical Methods.** *Advances in Chemistry, 2014*, 1–5.
11. Arifin, B., Tang, D. F., & Achmadi, S. S. (2014). **Transformation of Eugenol and Safrole Into Hydroxychavicol.** *Indonesian Journal of Chemistry, 15*(1), 77–85.
12. Rahman, M. F., Haykal, M. N., Siagian, N. A., Sriepindonnta, P. M., & Tampubolon, N. A. (2017). **Synthesis and Proapoptotic Activity on Cervical Cancer Cell of Ester Eugenol 1-(3-Methoxy-4-hydroxy)phenyl-2-propylmethanoate.** In *Materials Science and Engineering* (Vol. 299, pp. 1–7). Presented at the International Conference on Chemistry and Material Science (IC2MS), Malang.
13. Shakeri, M. S., Tajik, H., & Niknam, K. (2012). **Preparation of different amides via Ritter reaction from alcohols and nitriles in the presence of silica-bonded N-propyl sulphamic acid (SBNPSA) under solvent-free conditions.** *Journal of Chemistry Science, 124*(5), 1025–1032.
14. Behera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., & Banerjee, S. (2012). **UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation.** *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques, 3*(6), 1–6.
15. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. (2018). **Eugenol.** NIST National Institute of Standards and Technology. Retrieved from <https://webbook.nist.gov>
16. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. (2017). **Isoquinoline.** NIST National Institute of Standards and Technology. Retrieved from <https://webbook.nist.gov/cgi>
17. Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2018). *Spektroskopi Molekuler untuk Analisis Farmasi.* Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
18. Kristianingrum, S. (2016). **Spektroskopi Infra Merah (Infrared Spectroscopy, IR).** Universitas Negeri Yogyakarta.

19. Admin. (2017). **Isoquinoline (119-65-3)IR2**. *Chemical Book*. Retrieved from <https://www.chemicalbook.com>
20. Ramoo, B., Funke, M., Frazee, C., & Garg, U. (2016). **Comprehensive Urine Drug Screen by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS)**. In *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis* (pp. 125–131). New York: Humana.
21. Karasek, F. W., & Clement, R. E. (1988). *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Amsterdam: Elsevier Science.
23. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. (2014). **Isoquinoline, 3,4-dihidro-6,7-dimetoksi-1-metil-**. *NIST National Institute of Standards and Technology*. Retrieved from <https://webbook.nist.gov/cgi>
24. Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). **Brine Shrimp Lethality Assay**. *Bangladesh Journal Protocol*, 12, 186–189.
25. Asaduzzaman, M., Rana, M. S., Hasan, S. M. R., Hossain, M. M., & Das, N. (2015). **Cytotoxic (Brine Shrimp Lethality Bioassay) and Antioksidant Investigation of Barringtonia acutangula (L.)**. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6(8), 1179–1185.
26. Nguta, J., Mbaria, J. M., Gakuya, D., Gathumbi, P. K., Kabasa, J. D., & Kiama, S. G. (2012). **Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, Artemia salina L. (Artemiidae)**. *The Open Conference Proceedings Journal*, (3), 30–34.
27. Drummond, J. E. (2015). **Four Parameter Logistic Regression**. *MyAssays*. Retrieved from <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-regression>
28. Leonard Charles and Associates, Brenton VMS, Pesticide Research Institute, Shelterbelt Builders, & Garcia Associate. (2008). *Marin Municipal Water District Vegetation Management Plan*. Madera: Marin Municipal Water District.
29. Emslie, S. (2003). **Artemia salina**. *Animal Diversity Web*. Retrieved from [https://animaldiversity.org/accounts/Artemia\\_salina/](https://animaldiversity.org/accounts/Artemia_salina/)

30. AAT Bioquest. (2018). **LC50 Calculator**. *AAT Bioquest*. Retrieved from <https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator>
31. McGrew, G., Mallory, S., & Lee, J. (2007). **IR spectrum of eugenol**. *Chem 245!* Retrieved from <https://www.sas.upenn.edu/~genette/eugenol.htm>
32. Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardinias, I. G., & Buela, L. I. (2001). **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts**. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.

