

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Fisik dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya mulai bulan September hingga Desember 2017.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik *Ohaus*, seperangkat alat refluks, corong pisah, gelas kimia 250 mL, corong gelas, kertas saring, pipet ukur 10 mL, *magnetic stirrer*, bejana pengembang, *rotary evaporator* IKA RV 10 digital, *Orbital Shake Merk Edmund Buhler SM 25*, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, seperangkat alat kromatografi kolom, spektrofotometer FTIR Shimadzu 8400S, spektrofotometer UV-Visible *double beam* Shimadzu 1601, spektrometer <sup>1</sup>H-NMR serta HPLC Shimadzu LC-20AD Prominence.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 2,3-dimetil-1,4-hidrokuinon Sigma Aldrich *pro analysis*, timokuinon Sigma Aldrich *pro analysis*, KBrO<sub>3</sub> Merck *pro analysis*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M, dietil eter, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat Merck *pro analysis*, kloroform, n-heksana, AgNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> Sigma Aldrich *pro analysis*, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, asam bromopentanoat Sigma Aldrich *pro analysis*, etanol, asetonitril Sigma Aldrich *pro analysis*, n-oktanol Sigma Aldrich *pro analysis*, aquades, aquabidestilat dan asam asetat.

#### **3.3 Tahapan Penelitian**

##### **3.3.1 Tahap sintesis senyawa turunan timokuinon**

1. Sintesis 2,3-dimetil-1,4-benzokuinon dari 2,3-dimetil-1,4-hidrokuinon.
2. Sintesis bromoalkilkuinon menggunakan asam bromopentanoat.

3. Karakterisasi senyawa hasil sintesis menggunakan KLT, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR serta spektrometer  $^1\text{H-NMR}$ .
4. Analisis data.

### 3.3.2 Tahap uji kelarutan oktanol-air

1. Pembuatan buffer fosfat pH 7,4.
2. Uji kelarutan dalam oktanol-air senyawa timokuinon dan senyawa turunan hasil sintesis menggunakan HPLC.
3. Analisis Data

## 3.4 Prosedur Penelitian

### 3.4.1 Sintesis 2,3-dimetil-1,4-benzokuinon

Sintesis 2,3-dimetil-1,4-benzokuinon dengan cara mereaksikan 1,240 gram 2,3-diimetil-1,4-hidrokinon 9 mmol dengan 0,500 gram  $\text{KBrO}_3$  3 mmol, 9 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 0,45 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M sambil diaduk pada temperatur 40-50°C dan 70-80°C selama 30 menit dan 60 menit. Kemudian campuran diekstraksi menggunakan dietil eter. Lapisan organik dipisahkan dan dikeringkan menggunakan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat kemudian dievaporasi vakum pada temperatur 30°C dan kecepatan putaran 35 rpm. Senyawa yang dihasilkan dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan *silica gel* dengan eluen n-heksana:kloroform (7:3). Kemudian diuji sifat fisikokimia menggunakan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR dan spektrometer  $^1\text{H-NMR}$ .

### 3.4.2 Sintesis bromoalkilkuinon

Sintesis bromoalkilkuinon dilakukan dengan cara mereaksikan 0,380 gram asam bromopentanoat 2,1 mmol dengan 0,170 gram  $\text{AgNO}_3$  1 mmol dan campuran asetonitril dan air (2:1) sebanyak 7 mL sambil diaduk hingga mencapai temperatur 90 °C. Kemudian ditambahkan 0,272 gram 2,3-dimetil-1,4-benzokuinon 2 mmol serta larutan yang dibuat dari 0,456 gram  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  2 mmol dalam 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  yang ditambahkan tetes demi tetes ke dalam campuran sambil diaduk dan dipanaskan pada suhu 80-90°C selama 2 jam dan 3 jam. Campuran diekstrak dengan dietil eter, kemudian lapisan organik dipisahkan dan dikeringkan dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* vakum. Hasil sintesis dikarakterisasi menggunakan

kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen n-heksana:kloroform (7:3). Kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksana:kloroform (7:3). Uji sifat fisikokimia produk menggunakan spektrofotometer FTIR Shimadzu 8400S dan spektrofotometer UV-Visible *double beam* Shimadzu 1600.

### **3.4.3 Karakterisasi produk sintesis**

#### **a. Karakterisasi produk menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Pada karakterisasi KLT, produk hasil sintesis dan *starting material* ditotolkan pada plat silika dan dimasukkan dalam ruang pengembang yang telah diisi eluen n-heksana:kloroform (7:3). Plat silika dielusi hingga mencapai tanda batas. Kemudian spot noda yang terbentuk diamati dan ditandai di bawah sinar UV.

#### **b. Karakterisasi produk menggunakan spektrofotometer UV-Vis**

Karakterisasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis yaitu dengan melakukan *baseline* alat menggunakan etanol. Sampel yang telah diencerkan menggunakan etanol kemudian diukur absorbansi dan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang yang sama. Panjang gelombang maksimum sampel ditentukan dari nilai absorbansi antara 0-2. Adapun spesifikasi dari spektrofotometer UV-Vis yang digunakan adalah:

Tipe alat : *UV-Visible double beam* 1601  
Panjang gelombang sinar : 200-400 nm

#### **c. Karakterisasi produk menggunakan spektrofotometer FTIR**

Karakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR diawali dengan membuat background menggunakan serbuk KBr apabila sampel padatan atau menggunakan NaCl *windows* apabila sampel cairan. Bila sampel berupa padatan hasil sintesis dicampur dengan serbuk KBr dan dibentuk menjadi *pellet*, lalu masukkan dalam tempat sampel. Sedangkan apabila sampel berupa cairan hasil sintesis ditetaskan pada NaCl *windows* lalu dimasukkan dalam tempat sampel. Identifikasi dilakukan dengan menembakkan sinar infra merah ke sampel sehingga menghasilkan spektra puncak pada bilangan

gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Spesifikasi spektrofotometer infra merah yang digunakan adalah sebagai berikut:

Tipe alat : Shimadzu 8400S  
Interferometer : Tipe Michelson  
Sistem optik : Sinar tunggal  
Sumber inframerah : Keramik globular  
Medium sampel : NaCl window dan KBr

#### **d. Karakterisasi produk menggunakan spektrometer $^1\text{H-NMR}$**

Analisis menggunakan spektrometer  $^1\text{H-NMR}$  dilakukan dengan melarutkan 0,2 mg sampel pada *microtube* dalam 1 mL larutan  $\text{CDCl}_3$ . Sampel yang telah larut diletakkan ke dalam instrumen NMR kemudian diukur pergeseran kimia yang terjadi pada frekuensi 400 MHz.

### **3.4.4 Uji kelarutan dalam oktanol-air**

#### **a. Pembuatan larutan buffer fosfat pH 7,4**

Larutan buffer fosfat pH 7,4 dapat dibuat dengan cara mencampur 67 mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1 M dicampur dengan 330 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,1 M, disesuaikan hingga pH larutan 7,4.

#### **b. Preparasi sampel**

Larutan buffer fosfat pH 7,4 dijenuhkan dengan 1-oktanol. Penjenuhan dilakukan dengan mengambil 20 mL buffer fosfat pH 7,4 dan dimasukkan dalam corong pisah. Kemudian ditambah tetes demi tetes 1-oktanol, dikocok hingga jenuh (terbentuk 2 lapisan). Setelah itu kedua fasa dipisahkan dan fasa air ditampung.

Kemudian 1-oktanol juga dijenuhkan dengan buffer fosfat pH 7,4. Penjenuhan 1-oktanol dengan air dilakukan dengan mengambil 20 mL 1-oktanol dan dimasukkan dalam corong pisah. Kemudian ditambah tetes demi tetes buffer fosfat pH 7,4 dan dikocok hingga jenuh (terbentuk 2 lapisan). Setelah itu kedua fasa dipisahkan dan fasa organik ditampung.

Fasa 1-oktanol dan fasa air yang telah dijenuhkan kemudian dimasukkan dalam corong pisah, dikocok dan dipisahkan antara fasa 1-oktanol dan fasa air. Fasa 1-oktanol dan air yang telah dipisahkan kemudian dibiarkan minimal selama 24 jam.

Setelah itu senyawa hasil sintesis dan timokuinon dilarutkan dalam 1-oktanol yang telah dijenuhkan hingga mencapai konsentrasi 10 mM, kemudian ditambahkan fasa air yang telah dijenuhkan dengan perbandingan volume pada **Tabel 3.1**. Partisi a dan b dikocok dengan *orbital shaker* selama 1 jam pada temperatur kamar dengan kecepatan 200 rpm. Kemudian dipisahkan fasa 1-oktanol dan fasa airnya. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi dengan menggunakan HPLC.

**Tabel 3.1** Komposisi senyawa pada uji koefisien partisi

<b>Partisi Oktanol : Air (mL)</b>	<b>Massa C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>Br (mg)</b>	<b>Massa Timokuinon (mg)</b>
3 : 7	8,127	4,926

### c. Pengukuran kelarutan senyawa dengan HPLC

Timokuinon dan senyawa turunan *p*-benzokuinon dianalisis kelarutannya menggunakan instrumen HPLC. Analisis ini dilakukan dengan menginjeksikan 2 µL sampel pada instrumen HPLC dengan laju alir 0,5mL/menit. Spesifikasi alat yang digunakan adalah sebagai berikut:

- Tipe alat : Shimadzu LC-20AD Prominence
- Detektor : UV Shimadzu SPD20A pada  $\lambda_{\text{maks}}$  masing-masing senyawa (timokuinon: 254 nm; DMBQ4 : 259 nm)
- Fase diam : kolom C18, Shim-Pack CLC-ODS (5µm, 4,6 mm x 250 mm)
- Fase gerak : 97% (asetonitril:air (70:30)) dan 3% asam asetat.
- Temperatur : 37°C

