

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa turunan Timokuinon dengan melakukan modifikasi struktur pada senyawa awal Hidrokuinon dengan penambahan rantai alifatik yang terdiri 4 atom C dan 1 atom Br pada atom C ke 2 cincin para-benzokuinon. Pengukuran kadar sampel pada uji koefisien partisi dan kelarutan dalam air dari senyawa Timokuinon dan senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) ditentukan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan rantai samping berupa rantai bromobutil pada atom C nomor 2 dari struktur senyawa 1,4-benzokuinon.

4.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah koefisien partisi dan kelarutan dalam air dari hasil sintesis senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion).

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama lima bulan mulai bulan November sampai Maret 2016. Sintesis dilakukan di laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya. Identifikasi hasil sintesis dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR dilakukan di laboratorium UPT Instrumen, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Brawijaya. Pengujian koefisien partisi dan kelarutan dalam air senyawa Timokuinon dan hasil turunannya (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) dilakukan di Laboratorium Farmasetika, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

4.4 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, Hidrokuinon (Sigma-Aldrich), KBrO_3 (Merck KGaA), aquadem (*aqua demineralized*/ H_2O) (Goldeagle), H_2SO_4 2,5 M, dietil eter (Ferak), Na_2SO_4 (Merck), eluen n-heksana: kloroform = 1 : 1, senyawa 1,4-benzokuinon, asam bromovalerat, AgNO_3 (Merck KGaA), asetonitril (AcCN), amonium persulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Sigma-Aldrich), larutan etanol (Merck KGaA), serbuk KBr, timokuinon standar, akuades, pelarut n-oktanol, plat KLT silika gel (Merck KGaA), silika gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck KGaA), *sea sand* (Merck KGaA), kapas, larutan buffer Britton-Robinson, dan larutan buffer fosfat pH 7,4.

Alat yang digunakan yaitu *magnetic stirrer*, labu alas bulat, magnet, kondensor, tempat penangas air, corong pemisah, botol vial, pipet volume 10 ml dan 0,5 ml, bola penghisap, gelas pengaduk, spatula *stainless steel*, gelas kimia, *rotary evaporator vacuum* (IKA RV 10), kolom kromatografi, termometer, silika gel, *chamber* eluasi, pinset, pensil, penggaris, kuvet UV-Vis spektrofotometer

UV-Vis *double beam* UV-1600 series, pipet tetes, neraca analitik, spektrofotometer FT-IR Shimadzu 8400S, mortir, stamper ukuran kecil, sel tempat sampel, alat pembuat pelet KBr dan NaCl, corong pemisah (*shake-flask*), pH meter TOA DK, mikropipet, sinar UV 254 nm, dan *orbital shaker*.

4.5 Definisi Istilah/ Operasional

1. Reaksi oksidasi adalah reaksi pengurangan atom hidrogen (H) pada gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon (C) nomor 1 dan 4 dari molekul Hidrokuinon sehingga berubah menjadi gugus keton (=O) dan terbentuk molekul para-benzokuinon. Molekul hidrokuinon berubah menjadi molekul 1,4-benzokuinon.
2. Reaksi bromo alkilasi adalah reaksi penambahan rantai alkil alifatik yang terdiri dari empat atom karbon (C) dan satu atom brom (Br) yang terikat di atom karbon nomor 4 rantai alkil pada atom C nomor 2 struktur senyawa 1,4-benzokuinon sehingga berubah menjadi senyawa 2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion.
3. Hidrokuinon merupakan bahan kimia berupa serbuk putih dengan rumus molekul $C_6H_6O_2$ yang diperoleh dari Sigma-Aldrich. Fungsi Hidrokuinon sebagai senyawa awal (*starting material*) yang dimodifikasi pada reaksi tahap pertama sintesis senyawa turunan Timokuinon.
4. Kalium bromat adalah bahan kimia berupa serbuk putih dengan rumus molekul $KBrO_3$ yang diperoleh dari Merk KGaA. Fungsi $KBrO_3$ sebagai agen oksidator gugus hidroksil pada cincin kuinon menjadi gugus keton pada reaksi tahap pertama sintesis senyawa turunan Timokuinon (reaksi oksidasi).

5. Air merupakan suatu cairan jernih tidak berbau dengan rumus molekul H_2O yang telah dihilangkan kandungan mineralnya (*aqua demineralized*). Fungsi H_2O sebagai pelarut pada reaksi tahap pertama sintesis.
6. Asam sulfat merupakan cairan jernih tidak berbau dengan rumus molekul H_2SO_4 . Fungsi H_2SO_4 sebagai katalisator pada reaksi tahap pertama sintesis senyawa turunan Timokuinon.
7. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* yang dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Fungsi perlakuan pengadukan pada suhu $50-60^{\circ}C$ selama 30 menit adalah untuk menjalankan reaksi kimia (reaksi oksidasi) menggunakan metode refluks. Suhu dan waktu tersebut diperoleh dari literatur. Pada suhu dan waktu tersebut, reaksi oksidasi pada bahan awal dapat terjadi secara optimum sehingga hasil sintesis yang diperoleh dapat optimal.
8. Ekstraksi campuran dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair antara fase air dan fase eter menggunakan corong pisah dengan mengambil fase eter (lapisan atas). Fungsi perlakuan ekstraksi campuran hasil reaksi menggunakan dietil eter adalah untuk memisahkan senyawa hasil reaksi yang lebih larut pada fase dietil eter dari campuran mengandung air.
9. Natrium sulfat adalah padatan kristal berwarna putih dengan rumus molekul Na_2SO_4 yang diperoleh dari Merck KGaA. Fungsi Na_2SO_4 adalah untuk mengikat sisa air yang masih ada pada lapisan organik (fase eter) hasil ekstraksi senyawa hasil reaksi tahap pertama menggunakan dietil eter.
10. Evaporasi pelarut dilakukan menggunakan alat *rotary evaporator* IKA RV 10 dengan suhu $50^{\circ}C$ dan kecepatan 50 rpm. Fungsi perlakuan evaporasi dengan vakum adalah untuk memisahkan pelarut dietil eter dari senyawa

hasil sintesis tahap pertama sehingga diperoleh senyawa hasil reaksi tahap pertama (1,4-benzokuinon) yang bebas pelarut.

11. Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan senyawa berdasarkan sifat polaritas masing-masing komponen senyawa yang dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana : kloroform = 1 : 1 dengan fase diam SiO_2 . Fungsi perlakuan pemurnian padatan berwarna kuning yang dihasilkan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel dengan eluen kloroform adalah untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni dengan memisahkan senyawa yang diinginkan dari senyawa pengotor lainnya.
12. Spektrofotometer UV-Vis adalah suatu metode analisis yang dapat dilakukan untuk identifikasi senyawa hasil sintesis secara kualitatif berdasarkan transisi elektronik yang terjadi dan untuk analisis kuantitatif penentuan konsentrasi pada larutan sampel berdasarkan absorbansi larutan sampel. Fungsi perlakuan analisis struktur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis adalah untuk mengidentifikasi senyawa berdasarkan transisi elektroniknya dan untuk menentukan konsentrasi senyawa dalam larutan sampel pada penentuan kelarutan dalam air dari senyawa hasil sintesis dan Timokuinon.
13. Asam 5-bromovalerat adalah bahan kimia berupa serbuk putih dengan rumus molekul $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$ yang diperoleh dari Sigma-Aldrich. Fungsi adalah sebagai senyawa pendonor gugus alkil bromida (butil bromida). Asam bromovalerat mengalami reaksi dekarboksilasi dan menyumbangkan rantai alkil yang terdiri dari empat atom C dan satu atom Br pada atom C nomor 3 senyawa hasil reaksi sintesis tahap pertama (1,4-benzokuinon).
14. Reaksi dekarboksilasi adalah reaksi penghilangan gugus karboksilat dari senyawa asam bromovalerat.

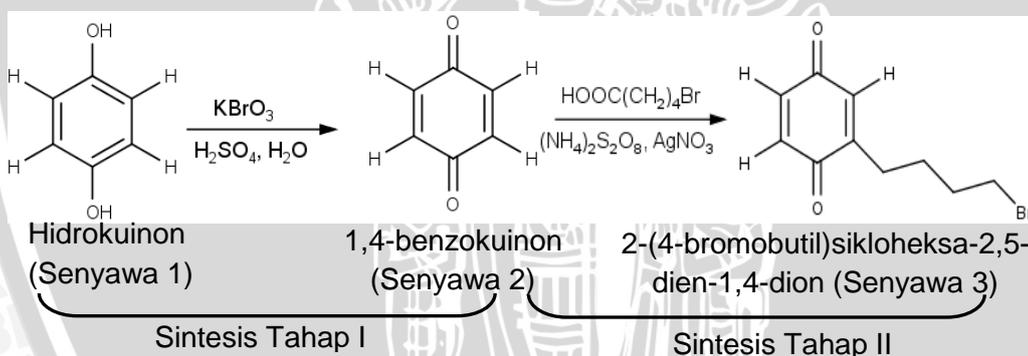
15. Fungsi senyawa 1,4-benzokuinon yaitu sebagai senyawa yang mengalami reaksi alkil brominasi pada sintesis tahap kedua. Senyawa 1,4-benzokuinon akan menerima rantai alkil yang terdiri dari empat atom C dan satu atom Br pada atom C nomor 2 cincin benzokuinon senyawa tersebut.
16. Perak nitrat adalah padatan kristal berwarna putih dengan rumus molekul AgNO_3 yang diperoleh dari Merck KGaA. Fungsi AgNO_3 adalah sebagai agen reduktor dan katalis pada reaksi tahap kedua sintesis senyawa turunan Timokuinon sehingga terjadi proses dekarboksilasi untuk membentuk alkil bromobutil.
17. Pengadukan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* yang dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Fungsi perlakuan pengadukan dan pemanasan pada suhu $70\text{-}89^\circ\text{C}$ selama 1,5 jam adalah untuk menjalankan reaksi kimia (reaksi dekarboksilasi) menggunakan metode refluks. Suhu dan waktu tersebut diperoleh dari literatur. Pada suhu dan waktu tersebut, reaksi dekarboksilasi pada asam bromovalerat dan bromo alkilasi pada senyawa 1,4-benzokuinon dapat terjadi secara optimum sehingga hasil sintesis yang diperoleh dapat optimal.
18. Metode *Shake-flask* adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan distribusi atau partisi senyawa antara dua fasa cair yang tidak saling campur pada fasa kesetimbangan.
19. Penjenuhan pelarut adalah langkah yang dilakukan untuk membuat suatu pelarut menjadi jenuh dengan pelarut lain, dilakukan dengan mengocok kuat pelarut sambil ditambah pelarut yang lain tetes demi tetes sampai diperoleh dua fase yang terpisah dengan batas antar fase yang jelas. Dengan penjenuhan pelarut, nilai koefisien partisi yang diperoleh akan lebih akurat

karena distribusi senyawa sampel pada kedua pelarut tidak terpengaruh oleh adanya interaksi antar kedua pelarut karena masing-masing pelarut telah terjenuhkan satu sama lain.

4.6 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

Penelitian dilakukan dengan melakukan sintesis senyawa turunan Timokuinon menggunakan bahan dasar Hidrokuinon. Untuk mengetahui senyawa yang diinginkan telah terbentuk, dilakukan analisis dengan beberapa alat spektrofotometer. Analisis hasil sintesis tahap I dan tahap II dilakukan dengan spektrofotometer FT-IR dan UV-Vis.

Tahapan reaksi kimia secara rinci tertera pada Lampiran 3. Tahapan dalam penelitian secara garis besar adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Tahapan Sintesis Senyawa Turunan Timokuinon

- Sintesis senyawa analog turunan Timokuinon dari Habbatussauda (*Nigella sativa*) meliputi senyawa 2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion yang dihasilkan dari reaksi dua tahap antara Hidrokuinon dengan alkil bromida.
- Analisis senyawa hasil sintesis meliputi pemeriksaan organoleptik (bentuk, warna, dan bau) dan analisis Kromatografi Lapis Tipis menggunakan eluen n-heksana : kloroform = 1 : 1 untuk dihitung nilai *Retardation factor* (Rf) atau waktu retensi dari senyawa hasil sintesis.

- c. Pemurnian senyawa hasil reaksi dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam SiO_2 . Senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, dan Spektrofotometer FT-IR.

4.6.1 Persiapan Bahan

4.6.1.1 Persiapan Hidrokuinon 9 mmol

Senyawa Hidrokuinon 9 mmol (BM = 110,11 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,991 gram padatan Hidrokuinon p.a dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik.

4.6.1.2 Persiapan KBrO_3 3 mmol

Senyawa KBrO_3 3 mmol (BM = 167 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,501 gram padatan KBrO_3 p.a dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik.

4.6.1.3 Persiapan AgNO_3 1 mmol

Senyawa AgNO_3 1 mmol (BM = 169,87 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,170 gram padatan AgNO_3 p.a dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik.

4.6.1.4 Pembuatan Larutan Asam Sulfat (H_2SO_4) 2,5 M

Larutan H_2SO_4 2,5 M (BM = 98,08 g/mol) dibuat dengan cara menimbang padatan H_2SO_4 p.a seberat 0,110 gram dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik, lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan aquadest sedikit demi sedikit. Kemudian larutan dipindahkan dalam labu ukur 0,45 ml dan ditambah aquadest hingga tanda batas.

4.6.1.5 Persiapan Asam Bromovalerat 2,1 mmol

Asam bromovalerat 2,1 mmol (BM = 181,03 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,380 gram padatan asam bromovalerat p.a dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik.

4.6.1.6 Persiapan Amonium Persulfat ((NH₄)₂S₂O₈) 2 mmol

Amonium persulfat ((NH₄)₂S₂O₈) 2 mmol (BM = 228,2 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,4564 gram padatan amonium persulfat p.a dalam gelas arloji menggunakan neraca analitik.

4.6.1.7 Pembuatan Eluen n-heksana : Kloroform = 1 : 1

Diambil pelarut n-heksana dan kloroform dengan volume yang sama menggunakan gelas ukur dan ditempatkan di satu wadah botol.

4.6.1.8 Persiapan Senyawa 1,4-benzokuinon 2 mmol

Senyawa 1,4-benzokuinon 2 mmol (BM = 108,1 g/mol) disiapkan dengan menimbang 0,216 gram padatan kuning senyawa 1,4-benzokuinon hasil sintesis tahap pertama di atas kertas perkamen menggunakan neraca analitik.

4.6.1.9 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat

Larutan buffer fosfat pH 7,4 dibuat dengan mencampur larutan 0,1 M natrium fosfat monobasik (NaH₂PO₄) (13,8 g/l; monohidrat, BM = 138,0 g/mol) dan 0,1 M natrium fosfat dibasik (Na₂HPO₄) (26,8 g/l; heptahidrat, BM = 268 g/mol) pada proporsi yang diinginkan dan volume akhir diatur sampai 200 ml dengan air *deionized*. Diatur pH akhir menggunakan pH meter yang sensitif. Larutan buffer fosfat dipakai dalam rentang pH 5,8-8,0. Rincian larutan yang dibutuhkan dan nilai pH larutan buffer yang dibuat dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Larutan Natrium Fosfat yang Dibutuhkan dan pH Buffer yang Dibuat

ml Natrium Fosfat, Monobasik	92,0	81,5	73,5	62,5	51,0	39,0	28,0	19,0
ml Natrium Fosfat, Dibasik	8,0	18,5	26,5	37,5	49,0	61,0	72,0	81,0
pH	6,12	6,53	6,72	6,94	7,15	7,4	7,61	7,87

4.6.1.10 Pembuatan Larutan Buffer Britton-Robinson

Penyiapan larutan buffer Britton-Robinson dilakukan dengan mencampur masing-masing 0,04 M asam asetat, fosfat, dan borat dengan volume sama. Ditambahkan sejumlah NaOH 1 M untuk membuat pH menjadi sebesar yang diinginkan. Nilai pH larutan buffer Britton-Robinson diukur dengan pH meter.

4.6.1.11 Pembuatan Larutan Baku Induk Timokuinon

Pada penentuan persamaan regresi linier kurva baku dalam penentuan kelarutan, dibuat larutan induk Timokuinon. Larutan induk Timokuinon konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang padatan Timokuinon sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dalam gelas kimia dengan sekitar 8 ml larutan Buffer Britton Robinson pH dimana senyawa tidak terion. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml secara kuantitatif. Dibilas gelas kimia dengan sedikit larutan Buffer lalu dimasukkan ke labu ukur tersebut, kemudian ditambahkan larutan Buffer sampai tanda batas.

4.6.1.12 Pembuatan Larutan Baku Kerja Timokuinon

Larutan baku kerja Timokuinon dibuat pada beberapa konsentrasi yaitu 50 ppm, 52 ppm, 56 ppm, dan 58 ppm. Larutan Timokuinon 50 ppm dibuat dari pengenceran larutan induk Timokuinon 1000 ppm dengan cara mengambil sebanyak 0,250 ml larutan induk Timokuinon 1000 ppm menggunakan mikropipet

dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu diencerkan dengan larutan Buffer sampai tanda batas. Larutan baku dikocok sampai homogen. Rincian pembuatan larutan baku kerja Timokuinon seperti pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Pembuatan Larutan Baku Kerja Timokuinon

Volume Total Larutan (ml)	Volume Larutan Timokuinon 1000 ppm yang Diambil (ml)	Konsentrasi Larutan Timokuinon yang Diperoleh (ppm)
5	0,250	50
5	0,260	52
5	0,280	56
5	0,290	58

4.6.1.13 Pembuatan Larutan Baku Induk Senyawa 3

Pada penentuan persamaan regresi linier kurva baku dalam penentuan kelarutan, dibuat larutan induk senyawa (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion). Larutan induk Timokuinon konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan menimbang padatan senyawa hasil sintesis tahap II sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dalam gelas kimia dengan sekitar 8 ml larutan Buffer dimana senyawa tidak terion. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml secara kuantitatif. Dibilas gelas kimia dengan sedikit larutan Buffer lalu dimasukkan ke labu ukur tersebut, kemudian ditambahkan larutan Buffer sampai tanda batas.

4.6.1.14 Pembuatan Larutan Baku Kerja Senyawa 3

Larutan baku kerja senyawa 3 dibuat pada beberapa konsentrasi yaitu 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, dan 125 ppm. Larutan baku 50 ppm dibuat dari pengenceran larutan induk turunan Timokuinon 1000 ppm dengan cara mengambil sebanyak 0,250 ml larutan induk 1000 ppm menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu diencerkan dengan larutan Buffer

Britton-Robinson sampai tanda batas. Larutan dikocok sampai homogen. Rincian pembuatan larutan baku kerja senyawa 3 ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Pembuatan Larutan Baku Kerja Senyawa 3

Volume Total Larutan (ml)	Volume Larutan Induk 1000 ppm yang Diambil (ml)	Konsentrasi Larutan Baku Senyawa 3 yang Diperoleh (ppm)
5	0,250	50
5	0,375	75
5	0,500	100
5	0,625	125

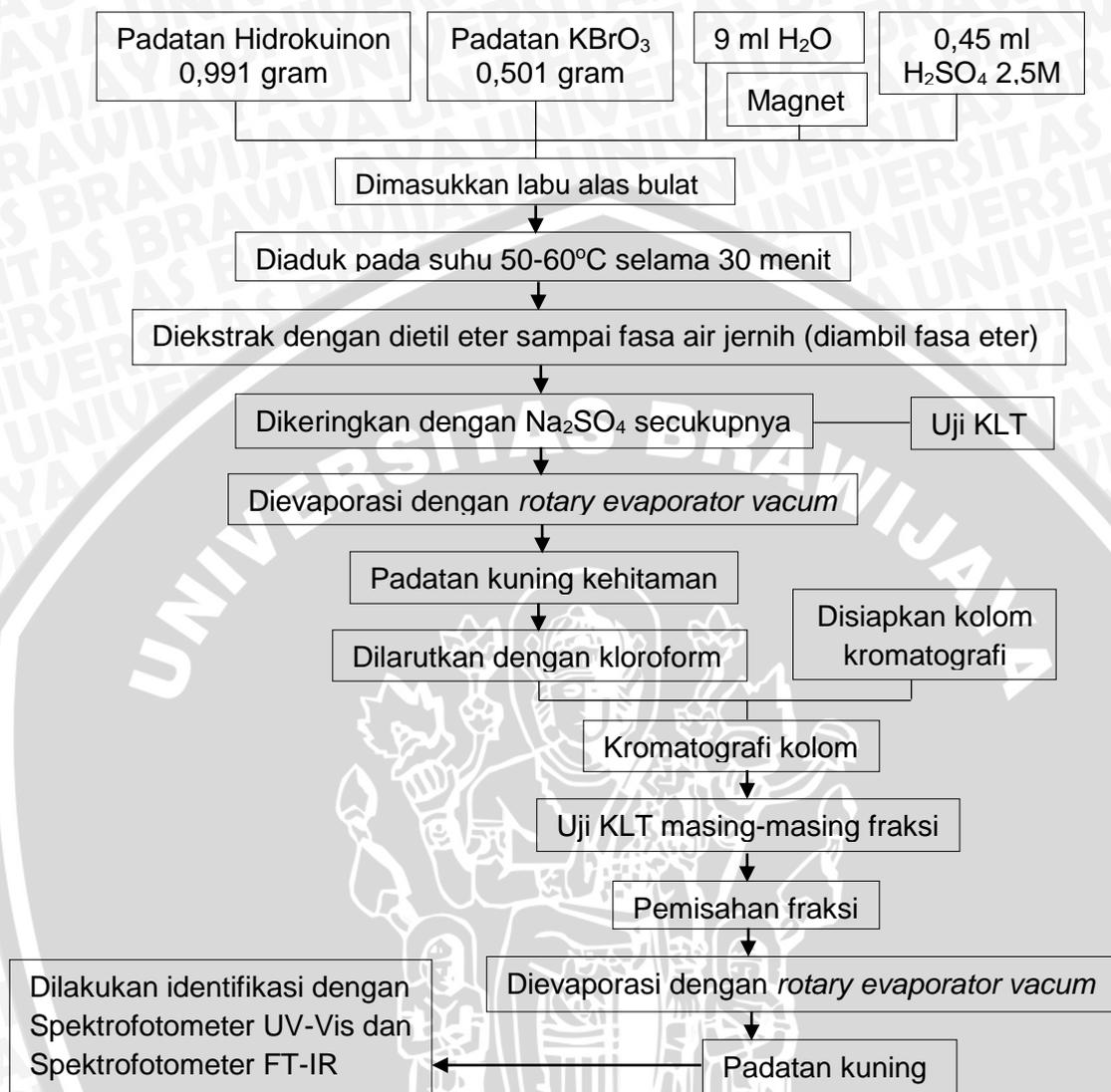
4.6.2 Proses Sintesis Senyawa Analog Turunan Timokuinon dari Habbatussauda (*Nigella sativa*)

Metode yang digunakan mengacu pada penelitian Antonenko pada tahun 2008. Tahapan sintesis yang dilakukan adalah sebagai berikut:

4.6.2.1. Sintesis Tahap I (1,4-benzokuinon)

Hidrokuinon (9 mmol), KBrO_3 (3 mmol), 9 ml H_2O , dan 0,45 ml H_2SO_4 (2,5 M) diaduk pada suhu 50-60°C selama 30 menit. Campuran reaksi diekstrak menggunakan dietil eter. Lapisan organik dipisahkan dan dikeringkan dengan Na_2SO_4 dan dievaporasi dengan vakum. Padatan berwarna kuning yang dihasilkan dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel dengan eluen kloroform. Senyawa yang dihasilkan diuji titik leburnya dan dianalisis strukturnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Antonenko, 2008).

Kerangka kerja sintesis tahap I dapat dilihat pada Gambar 4.2.

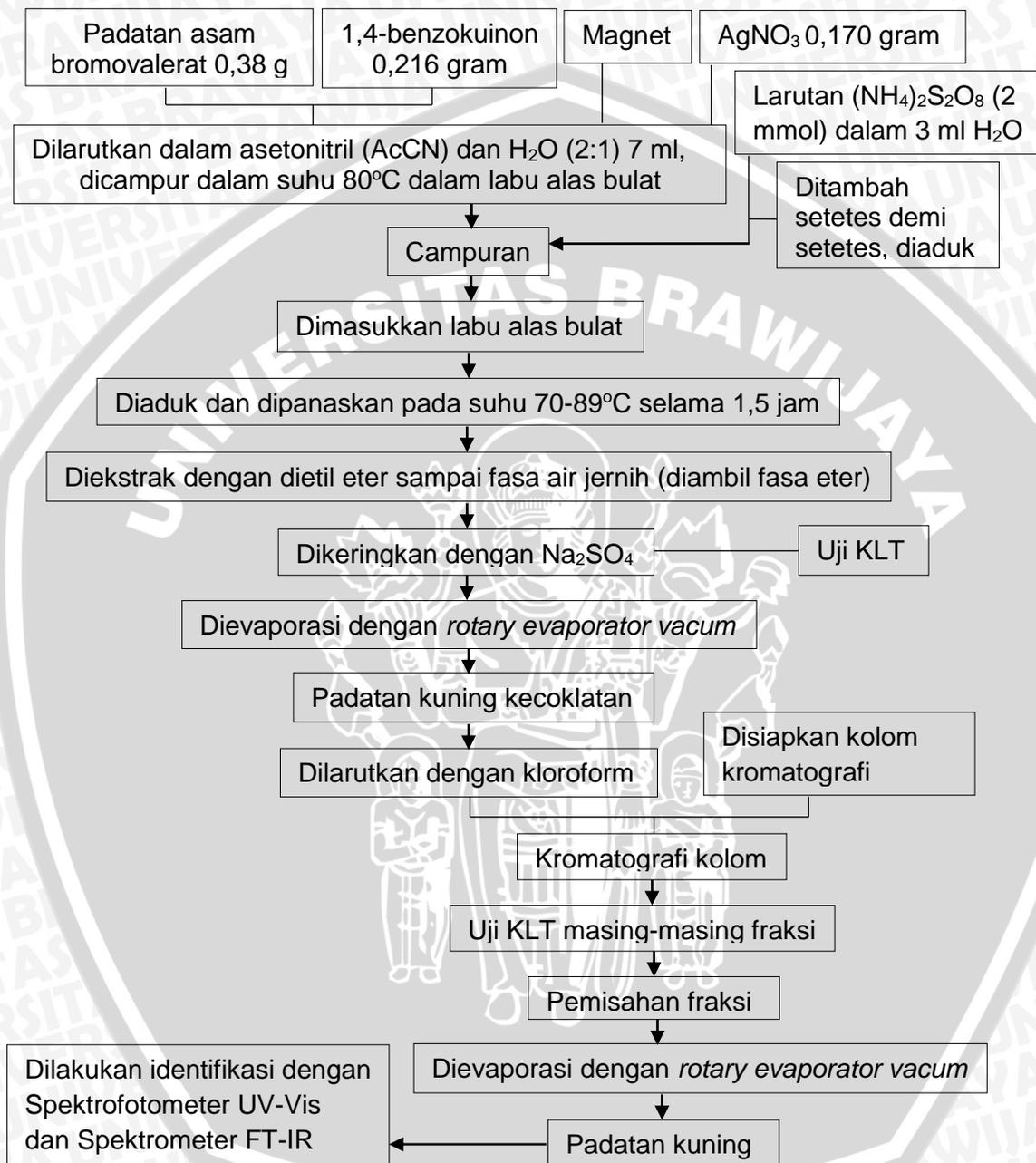


Gambar 4.2 Kerangka Kerja Sintesis Tahap I

4.6.2.2. Sintesis Tahap II (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion)

Asam bromovalerat (2,1 mmol), senyawa 1,4-benzokuinon (2 mmol), AgNO_3 (1 mmol) dilarutkan dalam asetonitril (AcCN) dan H_2O (2 : 1) dicampur dalam suhu 80°C . Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (2 mmol) dalam 3 ml H_2O ditambahkan setetes demi setetes ke dalam campuran sambil diaduk dan dipanaskan pada suhu $70-89^\circ\text{C}$ selama 1,5 jam. Setelah itu campuran diekstrak dengan dietil eter. Lapisan eter dicuci dengan air, dan dikeringkan dengan Na_2SO_4 . Pelarut

diuapkan dengan *rotary evaporator vacum*. Residu yang dihasilkan dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan kloroform (Antonenko, 2008).



Gambar 4.3 Kerangka Kerja Sintesis Tahap II

4.6.3 Identifikasi Hasil Sintesis dengan KLT

Produk hasil sintesis diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Tujuan uji KLT adalah untuk melihat polaritas senyawa dan

untuk mengidentifikasi atau deteksi awal senyawa hasil senyawa turunan yang terbentuk secara kualitatif. Eluen yang digunakan yaitu kloroform : n-heksana dengan perbandingan 1 : 1.

4.6.3.1 Optimasi Perbandingan Pelarut

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam uji KLT berdasarkan pada literatur. Pelarut yang dipilih adalah kloroform yang bersifat polar dan n-heksana yang bersifat non polar.

Langkah optimasi pelarut sebagai berikut:

- 1) Dibuat beberapa perbandingan pelarut yaitu kloroform seluruhnya; kloroform : n-heksana = 1 : 1; dan kloroform : n-heksana = 3 : 7. Masing-masing eluen dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah berisi kertas saring. *Chamber* ditutup dan ditunggu hingga jenuh.
- 2) Ditotolkan sejumlah tertentu larutan bahan awal Hidrokuinon dan senyawa hasil sintesis tahap I yang telah diarutkan dengan pelarut dietil eter menggunakan pipa kapiler 1 μL pada batas bawah plat KLT yang telah diberi batas atas dan bawah (dilakukan untuk sebanyak tiga plat KLT).
- 3) Setelah jenuh, kertas saring diambil dan plat dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dengan masing-masing perbandingan eluen.
- 4) Dilakukan eluasi sampai eluen mencapai batas atas.
- 5) Plat dikeluarkan dari dalam *chamber* dan diangin-anginkan hingga kering.
- 6) Diamati di bawah sinar UV panjang gelombang 254 nm dan ditandai noda yang terlihat menggunakan pensil.
- 7) Dihitung nilai R_f
- 8) Dipilih eluen yang menghasilkan nilai R_f pada rentang 0,3-0,7.

4.6.3.2 Penentuan Rf Senyawa dan Identifikasi Kualitatif

Retardation factor menunjukkan sifat senyawa yang dieluasi terhadap pelarut (fase gerak) dan fase diam yang digunakan. Penentuan nilai Rf senyawa hasil sintesis secara KLT dilakukan untuk memilih fraksi senyawa dari hasil pemisahan Kolom Kromatografi yang akan digunakan.

Langkah yang dilakukan sebagai berikut:

- 1) Ditotolkan sejumlah tertentu larutan bahan awal dan senyawa hasil sintesis masing-masing tahap menggunakan pipa kapiler 1 μ L pada satu plat KLT yang telah diberi batas atas dan bawah (dilakukan untuk sebanyak dua plat KLT).
- 2) Plat kemudian dimasukkan kedalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan eluen kloroform : n-heksana = 1 : 1.
- 3) Dilakukan eluasi sampai eluen mencapai batas atas plat KLT.
- 4) Plat diangin-anginkan hingga kering.
- 5) Diamati di bawah sinar UV panjang gelombang 254 nm dan ditandai noda yang terlihat menggunakan pensil.
- 6) Dihitung nilai Rf.

Terbentuknya senyawa hasil sintesis (produk) biasanya dapat dilihat dari adanya perbedaan antara Rf senyawa hasil sintesis dengan Rf masing-masing bahan pereaksi (reaktan). Nilai Rf senyawa hasil sintesis yang diperoleh tersebut kemudian digunakan sebagai acuan fraksi yang diambil dari kolom kromatografi. Berdasarkan literatur, nilai Rf yang baik dari hasil uji KLT untuk dilakukan kolom kromatografi adalah sebesar 0,3-0,7.

4.6.4 Identifikasi Hasil Sintesis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk memprediksi struktur senyawa yang diperoleh dari hasil sintesis dengan melihat transisi elektronik senyawa yang menimbulkan puncak yang menunjukkan panjang gelombang senyawa.

Interpretasi hasil sintesis masing-masing tahap dengan spektrofotometer UV-Visible *double beam* dilakukan secara kualitatif dengan beberapa tahap yaitu:

1. Dilakukan *baseline* pelarut etanol pada panjang gelombang 200-500 nm. Setiap penggantian pelarut sampel dilakukan *baseline* terlebih dahulu.
2. Sejumlah kecil padatan sampel diambil kemudian dilarutkan dalam beberapa mililiter etanol yaitu sekitar 1-2 mg dalam 5 ml.
3. Apabila setelah dicek puncak serapan dan hasil puncak yang diperoleh terlalu tinggi (di atas nilai absorbansi 1,5), sampel diencerkan kembali dengan pelarut etanol dan dicek kembali puncaknya.
4. Kemudian ditentukan absorbansi dan panjang gelombang maksimal pada rentang 200-500 nm. Panjang gelombang maksimal dari sampel ditentukan dari puncak yang memiliki nilai absorpsi di bawah 1,5 karena pada absorbansi tersebut, puncak dapat dibaca dengan jelas.
5. Diamati puncak panjang gelombang maksimal dan ditentukan jenis transisi elektronik yang terjadi dari masing-masing puncak tersebut.

Spesifikasi spektrofotometer UV-Vis yang digunakan:

Tipe alat : UV-1600 series

Panjang gelombang sinar : 340,8 nm

4.6.5 Identifikasi Hasil Sintesis dengan Spektrofotometer FT-IR

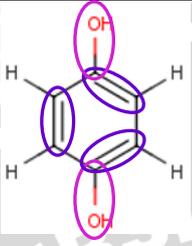
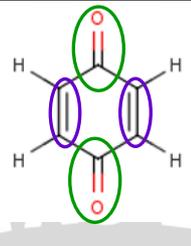
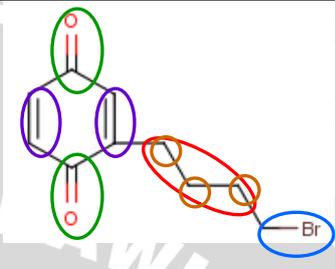
Spektrofotometer FT-IR dapat menunjukkan puncak dengan intensitas tertentu pada bilangan gelombang antara $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Karena senyawa hasil reaksi tahap I pada penelitian ini berupa serbuk padat dan hasil reaksi tahap II berbentuk semipadat, maka dipersiapkan sampel pengukuran dalam bentuk pelet KBr dan NaCl. Langkah yang dilakukan yaitu:

- 1) Pertama, dibuat pelet sampel dengan cara mencampur sejumlah kecil padatan sampel dengan serbuk KBr sebanyak 0,07 gram pada alat pembuat pelet. Pelet NaCl dibuat dengan melarutkan sedikit sampel dengan pelarut dietil eter dan larutan sampel diusapkan ke pelet NaCl.
- 2) Pelet kemudian diletakkan pada *sample holder* dan dimasukkan ke dalam ruang sampel pada alat spektrofotometer FT-IR.
- 3) Dilakukan analisis gugus fungsi senyawa dengan spektrofotometer FT-IR.
- 4) Diamati puncak yang muncul dan ditentukan gugus fungsi dari masing-masing puncak yang muncul tersebut.
- 5) Hasil gugus fungsi tersebut kemudian dihubungkan dengan hasil transisi elektronik yang tampak pada pemeriksaan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sehingga dapat digambarkan struktur molekul yang terdapat pada sampel yang diuji.

Spesifikasi alat yang digunakan:

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

Tabel 4.4 Interpretasi Senyawa Hasil Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Serapan	Hidrokuinon	Senyawa 1,4-benzokuinon	Senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion)
			
Struktur:	<ul style="list-style-type: none"> • Ikil Bromida (C - Br) • Keton (C=O) • Alkena (C=C) • C-C • C-H • C - OH 		

4.6.6 Uji Koefisien Partisi dengan Pelarut n-Oktanol/Buffer Berair

Di bawah ini merupakan langkah yang dilakukan pada uji koefisien partisi senyawa (Andres *et al.*, 2015):

- 1) Disiapkan larutan buffer berair fosfat pH 7,4.
- 2) Dilakukan penjenuhan fase berair dengan n-oktanol dengan langkah sebagai berikut:
 - a. Sebanyak 20 ml fase berair dimasukkan ke dalam corong pisah.
 - b. Ditambahkan tetes demi tetes n-oktanol dan dikocok hingga jenuh yang ditandai dengan terpisahnya fase berair dan fase n-oktanol. Massa jenis fase berair sebesar 1 g/cm³ dan n-oktanol sebesar 0,827 g/cm³.
 - c. Dibuang fase n-oktanol (fase atas).

- 3) Dilakukan penjuhan n-oktanol dengan fase berair dengan langkah sebagai berikut:
 - a. Sebanyak 20 ml n-oktanol dimasukkan ke dalam corong pisah.
 - b. Ditambahkan tetes demi tetes fase berair dan dikocok hingga jenuh yang ditandai dengan terpisahnya fase berair dan fase n-oktanol.
 - c. Dibuang fase berair (fase bawah).
- 4) Fase berair dan n-oktanol yang telah jenuh dimasukkan secara berturut-turut ke dalam corong pisah kemudian dikocok kuat dan dipisahkan. Masing-masing fase didiamkan 24 jam untuk memastikan kedua fase terpisah.
- 5) Senyawa Timokuinon dan senyawa turunan masing-masing dilarutkan dalam n-oktanol yang telah dijenuhkan hingga mencapai konsentrasi 10 mM, kemudian ditambahkan fase berair yang telah dijenuhkan. Perbandingan volume pelarut n-oktanol dan fase berair serta jumlah bahan yang digunakan tertera pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Perbandingan Volume Pelarut n-Oktanol dan Fase Berair serta Jumlah Bahan yang Digunakan

Partisi	Va (ml)	Vo (ml)	Senyawa Timokuinon dalam n-Oktanol (mg)	Senyawa Turunan dalam n-Oktanol (mg)
a	5	5	8,210 mg	12,155 mg
b	7	3	4,926 mg	7,293 mg

- 6) Partisi a dan b dikocok selama satu jam menggunakan *orbital shaker* dalam labu Erlenmeyer yang telah ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik *wrap* pada suhu kamar $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

- 7) Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditunggu hingga tercapai kesetimbangan yang ditandai dengan cairan didalam corong pisah tidak bergerak.
- 8) Setelah tercapai kesetimbangan, dilakukan pemisahan fase berair (fase bawah) dan fase n-oktanol (fase atas) pada partisi a dan b.
- 9) Dilakukan analisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan dua kali pengulangan. Langkah yang dilakukan sebagai berikut:
 - a. Ditentukan panjang gelombang maksimum masing-masing senyawa dengan pelarut etanol.
 - b. Dibuat kurva baku masing-masing senyawa dalam pelarut n-oktanol dan diukur absorbansi sampel dalam larutan pada panjang gelombang yang ditentukan sebelumnya.
 - c. Dibuat kurva baku masing-masing senyawa dalam pelarut buffer berair dan diukur absorbansi sampel.
 - d. Dihitung konsentrasi sampel dalam pelarut n-oktanol dan buffer berair dengan memasukkan nilai absorbansi sebagai y pada persamaan regresi linier absorbansi kurva baku.
- 10) Dilakukan perhitungan koefisien partisi dengan rumus :

$$\log P = \log \frac{C_{n\text{-oktanol}}}{C_{\text{buffer berair}}} \quad (\text{Andres et al., 2015})$$

Keterangan :

$C_{n\text{-oktanol}}$ = konsentrasi sampel dalam larutan n-oktanol (ppm)

$C_{\text{buffer berair}}$ = konsentrasi sampel dalam larutan buffer berair (ppm)

4.6.7 Uji Kelarutan dalam Air

Penentuan kelarutan menggunakan *saturation shake-flask solubility method*. Langkah yang dilakukan antara lain (Baka *et al.*, 2007):

1) Ditentukan pKa senyawa 3 (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) dan Timokuinon dengan langkah sebagai berikut:

1. Disiapkan enam larutan Na_2HPO_4 ($M_r = 142 \text{ g/mol}$) 100 mM dengan pH yang berbeda. Volume NaOH dan HCl yang digunakan pada masing-masing larutan dan nilai pH tertera pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Komposisi Larutan NaOH dan HCl serta pH Larutan

Larutan	Volume NaOH 1 M Setiap 10 ml Fosfat (μl)	Volume HCl Setiap 10 ml Fosfat (μl)	Nilai pH yang Diperoleh
1	40	---	
2	10	---	
3	---	---	
4	---	10	
5	---	20	
6	---	30	

2. Disiapkan larutan senyawa 1% dalam etanol.
3. Diambil alikuot 200 μl dan dilarutkan dalam 10 ml air.
4. Dicampurkan 10 ml masing-masing larutan fosfat dengan 1 ml larutan senyawa dan diberi tanda A, B, C, D,E, dan F.
5. Diukur absorbansi larutan A, B, C, D,E, dan F pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal hasil *scanning* kemudian data dituliskan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Absorbansi Larutan Sampel

Larutan	$y = [H^+]$	Absorbansi	$x = 1/Abs$
A			
B			
C			
D			
E			
F			

6. Ditentukan nilai a, dimana nilai a menunjukkan besar K_a senyawa.
7. Ditentukan nilai pKa pH buffer dimana senyawa tidak terion.

2) Disiapkan larutan buffer.

Berdasarkan literatur, larutan buffer Britton-Robinson dapat digunakan pada rentang pH 2,5-11,5. Kekuatan ionik larutan buffer Britton-Robinson adalah 0,089.

3) Ditentukan kelarutan setimbang bentuk tidak terion dari sampel menggunakan metode *shake-flask* dengan melakukan tiga pengulangan independen secara berurutan. Langkah yang dilakukan sebagai berikut:

1. Untuk setiap percobaan, ditambahkan sampel sejumlah 10 mg secara hati-hati menggunakan spatula ke 5 ml buffer berair dalam labu Erlenmeyer.
2. Larutan sampel kemudian ditutup dan diaduk selama 6 jam dengan *orbital shaker* pada suhu 25°C dengan kecepatan 200 rpm untuk memberi waktu sistem mencapai keseimbangan termodinamik.
3. Didiamkan sampel selama 18 jam guna proses sedimentasi untuk pemisahan fase secara alami. Cara lain untuk memisahkan fase padat dan supernatan pada sampel yang tidak dapat menjadi jernih (senyawa membentuk misel atau agregasi dan menghasilkan larutan keruh) yaitu

dengan dilakukan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

4. Tiga alikuot supernatan diambil masing-masing dengan mikropipet dari larutan jenuh dan dilarutkan dengan pelarut jika perlu, dan konsentrasi sampel pada masing-masing alikuot diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.
5. Ditentukan panjang gelombang maksimal masing-masing senyawa.
6. Ditentukan persamaan regresi linier dari kurva baku (absorbansi larutan induk 10 mg/10 ml pada panjang gelombang hasil *scanning* sebelumnya) dari masing-masing sampel pada pH dimana sampel tidak terion menggunakan 5 titik konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm.
7. Dihitung besar konsentrasi masing-masing alikuot dengan memasukkan data absorbansi yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis ke dalam persamaan regresi linier. Konsentrasi dalam satuan mg/ml. Hasil yang dilaporkan berarti setidaknya 9 konsentrasi yang terukur pada satu suhu yang digunakan.
- 4) Dihitung hasil rata-rata dan standar deviasi (SD).

4.7 Analisis Data

Hasil sintesis senyawa yang didapat kemudian diuji kualitatif dengan analisis menggunakan KLT. KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dilakukan untuk mengetahui distribusi senyawa hasil sintesis berupa nilai R_f (*Retardation Factor*) dibandingkan dengan senyawa standar Timokuinon yang terlihat jelas di bawah sinar UV. Selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa hasil sintesis dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometer FT-IR.

Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis menghasilkan data berupa spektra dalam grafik hubungan antara panjang gelombang (λ) dengan absorbansi (A). Dari puncak panjang gelombang maksimal ditentukan jenis transisi elektronik yang terjadi dari masing-masing puncak tersebut. Struktur senyawa berpengaruh terhadap panjang gelombang senyawa tersebut.

Analisis dengan spektrofotometer FT-IR menghasilkan data spektra IR dalam grafik hubungan antara frekuensi (cm^{-1}) dengan transmitansi (%T). Dari data spektra IR dapat diketahui gugus fungsi yang terdapat pada senyawa hasil sintesis. Setiap senyawa mempunyai gugus fungsi masing-masing. Perbedaan gugus fungsi senyawa yang tampak pada spektra IR dapat memberikan informasi adanya senyawa hasil sintesis yang terbentuk.

4.7.1 Uji Presisi dan Akurasi

Perhitungan nilai rata-rata koefisien partisi dan kelarutan dihitung dengan rumus $\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n}$ dimana \bar{x} adalah rata-rata nilai koefisien partisi dan kelarutan, x_i adalah nilai koefisien partisi dan kelarutan dalam air ke i , dan n adalah jumlah pengulangan. Data koefisien partisi dan kelarutan dalam air yang terkumpul kemudian disajikan dalam persamaan rata-rata \pm SD.

Salah satu persyaratan dasar dalam analisis adalah ketelitian dan ketepatan. Hasil suatu penelitian dikatakan teliti (presisi) apabila antar satu nilai dengan nilai yang lain dalam satu seri pengukuran mempunyai selisih yang sangat kecil, dan hasil analisis dikatakan tepat (akurat) jika nilai rata-rata hasil pengukuran mendekati nilai sebenarnya. Ketelitian hasil yang diperoleh dapat ditentukan dengan penentuan nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi

(KV) menggunakan rumus: $SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$ dan $KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$, dimana SD

adalah standar deviasi, KV adalah koefisien variasi, \bar{x} adalah rata-rata nilai koefisien partisi dan kelarutan dalam air, x_i adalah nilai koefisien partisi dan kelarutan dalam air ke i , dan n adalah jumlah pengulangan. Semakin kecil nilai SD dan KV dari semua hasil pengukuran yang diperoleh berarti bahwa metode yang digunakan semakin teliti (presisi). Hasil pengukuran dikatakan presisi apabila nilai KV < 2%. Namun kriteria ini sangat fleksibel bergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004).

Ketepatan (akurasi) dapat ditentukan dengan menghitung %kesalahan relatif menggunakan rumus: $\% \text{kesalahan relatif} = \frac{\bar{x} - x_i}{\bar{x}} \times 100\%$ dimana \bar{x} adalah rata-rata nilai koefisien partisi dan kelarutan dalam air; x_i adalah nilai koefisien partisi dan kelarutan dalam air ke i . Nilai %kesalahan relatif yang semakin kecil (< 5%) menunjukkan ketepatan hasil pengukuran yang semakin tinggi.

4.7.2 Uji t Tidak Berpasangan

Dilakukan analisis dengan uji t tidak berpasangan (keberartian) untuk mengetahui perbedaan nilai rata-rata koefisien partisi dan kelarutan dalam air dari senyawa Timokuinon dan senyawa (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion). *Independent t-test* (uji t tidak berpasangan) merupakan salah satu metode pengujian hipotesis pada data yang bebas (tidak berpasangan). Syarat dilakukan uji t tidak berpasangan adalah kedua kelompok bebas (tidak berpasangan), data tergolong data numerik, dan mempunyai distribusi normal. Pertama, dilakukan uji apakah kedua data menyebar normal atau tidak dengan aplikasi statistik SPSS sebelum melakukan uji t tidak berpasangan. Distribusi data dikatakan normal jika nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$).

Pada penelitian ini akan dilakukan perbandingan nilai log P (koefisien partisi) dan kelarutan dalam air dari senyawa Timokuinon dan turunannya (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion). Untuk menyatakan bahwa hasil rata-rata masing-masing koefisien partisi dan kelarutan dalam air dari kedua senyawa besarnya sama atau tidak beda nyata, dinyatakan dengan hipotesis nol (H_0).

Hipotesis nilai koefisien partisi (log P) yaitu:

H_0 : Koefisien partisi senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) pada pelarut n-oktanol/air lebih kecil dari senyawa Timokuinon.

H_1 : Koefisien partisi senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) pada pelarut n-oktanol/air lebih besar dari senyawa Timokuinon.

Hipotesis kelarutan dalam air yaitu:

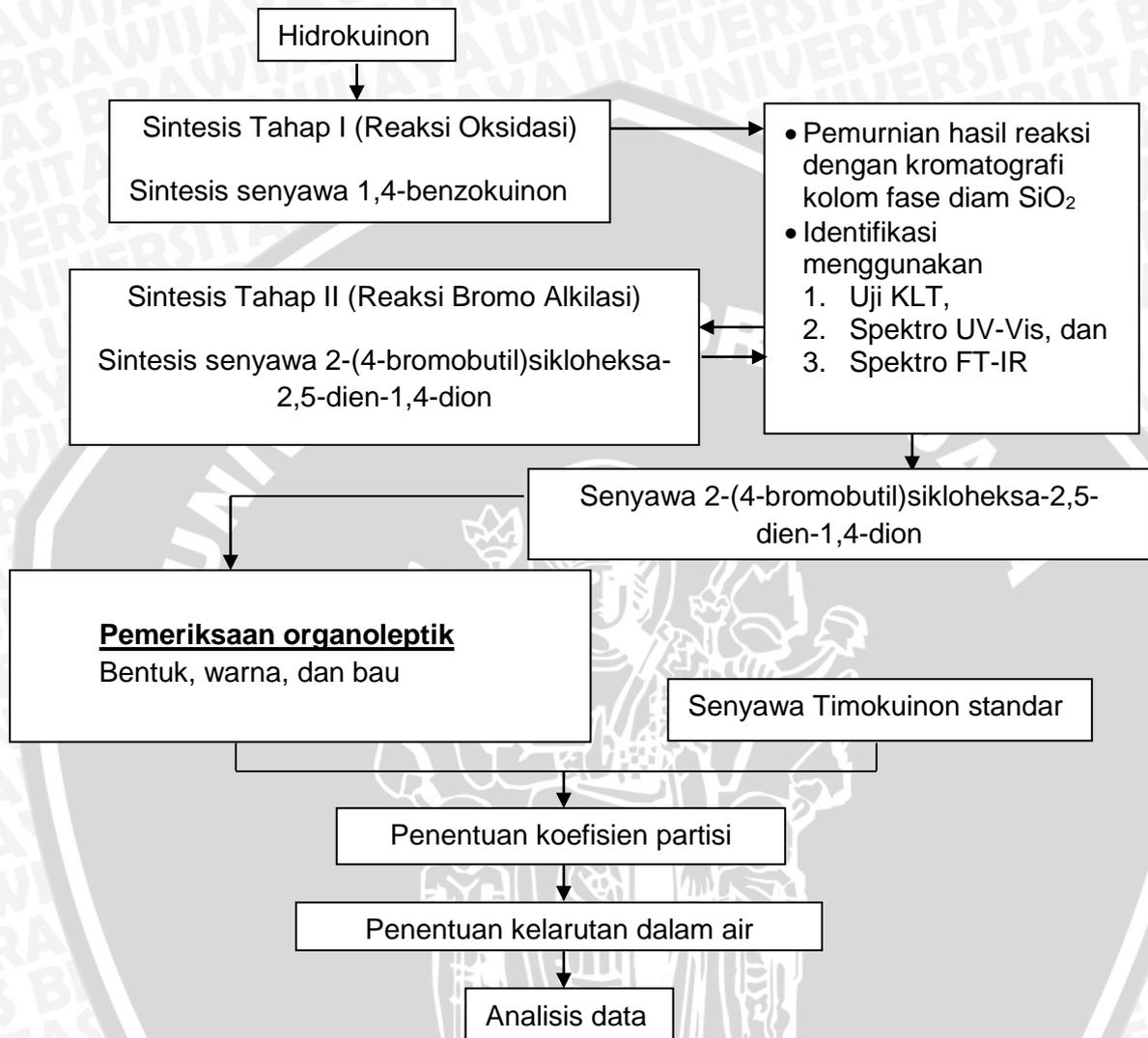
H_0 : Kelarutan dalam air dari senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) pada pelarut n-oktanol/air lebih besar dari senyawa Timokuinon.

H_1 : Kelarutan dalam air dari senyawa turunan Timokuinon (2-(4-bromobutil)sikloheksa-2,5-dien-1,4-dion) pada pelarut n-oktanol/air lebih kecil dari senyawa Timokuinon.

Kesimpulan: H_0 diterima jika $t_{hitung} < t_{tabel}$

H_0 ditolak jika $t_{hitung} > t_{tabel}$

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.4 Alur Penelitian