

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam. Selain terkenal akan rempah-rempahnya, Indonesia juga terkenal akan minyak atsirinya terutama minyak nilam. Nilam termasuk komoditas unggulan nasional dengan luas 9.600 ha dan produksi sebesar 2.100 ton minyak [1]. Bahkan, Ditjenbun menyatakan bahwa minyak nilam Indonesia telah mampu menjadi pemasok 90% kebutuhan minyak nilam di dunia [2]. Pada tahun 2004, ekspor nilam Indonesia mencapai 2.074 ton atau senilai US\$ 27,137juta. Hal ini menunjukkan minyak nilam berpotensi dieksplor untuk ditingkatkan nilai jual dan nilai gunanya.

Salah satu upaya eksplorasi minyak nilam dapat diarahkan pada keperluan obat-obatan. Beberapa literatur menyebutkan bahwa minyak nilam memiliki aktivitas sebagai antivirus, antijamur [3], antibakteri [4] dan antiinflamasi [5]. Aktivitas biologis dalam minyak nilam dipengaruhi oleh kandungan dari patchouli alkohol dalam minyak nilam. Semakin tinggi kadar patchouli alkohol maka aktivitas biologis minyak nilam juga meningkat [4]. Patchouli alkohol dibuktikan mampu menjadi agen anti-influenza A (H2N2) [6]. Maka dari itu, salah satu fokus dari penelitian ini adalah melakukan sintesis dari patchouli alkohol menjadi molekul baru yang lebih besar manfaat dan potensinya untuk keperluan obat-obatan.

Patchouli alkohol merupakan penyusun utama dalam minyak nilam. Penyusun lain dari minyak nilam antara lain α -gurjunena, trans- β -karyofilena, α -guaiena, scychellena, α -patchoulena, isofensil alcc, β -kamigrena, δ -guaiena dan globulol [7,8]. Isolasi patchouli alkohol dari minyak nilam dapat dilakukan dengan distilasi pengurangan tekanan hingga menjadi 4-6 mmHg yang menghasilkan kadar tertinggi 74,55 % pada pemanasan 130-135 °C [9]. Penggunaan distilasi dapat menghasilkan distilat yang lebih murni, sedangkan proses dalam keadaan pengurangan tekanan ditujukan untuk menjaga agar suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi sehingga mencegah kerusakan atau dekomposisi bahan akibat panas yang terlalu tinggi dan lama [10].

Patchouli alkohol memiliki kerangka dan gugus fungsi yang menjadikannya berpotensi menjadi bahan dasar (*starting material*) sintesis. Penelitian yang pernah dilaporkan yaitu esterifikasi terhadap patchouli alkohol dengan asam asetat dan katalis asam sulfat menghasilkan patchouli asetat [7,11]. Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis senyawa organonitrogen aromatik dari patchouli alkohol. Senyawa organonitrogen aromatik yaitu senyawa hidrokarbon yang mengandung atom N dalam berbagai variasi ikatannya dan memiliki gugus aromatik, yang umumnya memiliki sifat-sifat biologis maupun fisiologis berkaitan dengan potensinya sebagai bahan obat untuk penyakit yang berkaitan dengan gangguan sistem syaraf pusat (*central nervous system*) seperti alzheimer, tekanan mental, dan parkinson [12].

Sintesis senyawa organonitrogen dari patchouli alkohol dapat dilakukan dengan reaksi *Ritter*. Reaksi *Ritter* adalah reaksi sintesis suatu amida dari nitril aromatis dan karbokation yang dapat berasal dari alkohol dengan adanya asam [13]. Patchouli alkohol merupakan alkohol tersier sehingga akan mampu membentuk karbokation tersier saat didehidrasi dengan asam sulfat [8]. Karbokation tersier merupakan karbokation yang paling stabil karena adanya efek hiperkonjugasi. Pembentukan intermediet yang stabil pada patchouli alkohol akan memudahkan penyerangan oleh nitril. Nitril yang digunakan pada penelitian ini adalah benzonitril sehingga terbentuk senyawa organonitrogen aromatik.

Senyawa organonitrogen merupakan senyawa heteroatom yang memiliki gugus N. Gugus ini memiliki afinitas dan kepolaran yang memungkinkan terjadinya interaksi molekuler melalui mekanisme biokimia di dalam tubuh. Interaksi ini menyebabkan senyawa organonitrogen diduga memiliki daya bunuh *in vivo* atau toksik terhadap organisme hewan. Salah satu organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah *Arthemia salina* Leach [14] dan metode pengujiannya dinamakan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil dari metode ini dinyatakan dengan nilai *Lethality Concentration 50* (LC₅₀) dalam µg/mL. Metode BSLT sering digunakan karena cepat, murah, mudah dikerjakan, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya [15].

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Senyawa organonitrogen aromatik apa yang terbentuk jika direaksikan patchouli alkohol hasil isolasi dari minyak nilam dengan benzonitril?
2. Bagaimana sifat toksisitas senyawa organonitrogen aromatik hasil sintesis?

1.3 Batasan Masalah

1. Patchouli alkohol yang digunakan sebagai *starting material* diisolasi dari minyak nilam yang diperoleh dari petani minyak nilam Kabupaten Blitar dengan metode distilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan.
2. Reaksi *Ritter* antara patchouli alkohol dengan benzonitril dilakukan pada suhu kamar dengan katalis asam sulfat. Senyawa organonitrogen hasil reaksi *Ritter* tidak dimurnikan.
3. Karakterisasi patchouli alkohol hasil isolasi dari minyak nilam dan senyawa organonitrogen hasil sintesis menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM) dan Spektrometer FTIR.
4. Uji toksisitas senyawa organonitrogen hasil sintesis dilakukan terhadap *Artemia salina* Leach.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Melaksanakan sintesis senyawa organonitrogen aromatik melalui reaksi *Ritter* antara patchouli alkohol dengan benzonitril.
2. Mengetahui toksisitas senyawa organonitrogen aromatik hasil sintesis.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai molekul hasil dari pengayaan patchouli alkohol (kandungan dalam

minyak nilam) melalui reaksi ritter serta potensinya dalam bidang farmakologi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minyak Nilam

Minyak nilam adalah minyak yang diperoleh dengan cara penyulingan uap dari daun tanaman *Pogestemon cablin* BENTH serta memiliki standar mutu seperti tercantum pada Tabel 2.1 [16]. Minyak nilam yang telah dianalisis menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM) mengandung beberapa senyawa seperti pada Tabel 2.2 [7].

Tabel 2.1: Spesifikasi persyaratan mutu minyak nilam

No.	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Warna	-	Kuning muda sampai coklat kemerahan
2	Bobot jenis 20°C	-	0,950-0,975
3	Indeks bias (nD^{20})	-	1,507-1,515
4	Kelarutan dalam etanol 90% pada suhu 20°C ± 3°C	-	Larutan (jernih) atau opalesensi ringan dalam perbandingan volume
5	Bilangan asam	-	1:10
6	Bilangan ester	-	Maks 8,0
7	Putaran optik	-	Maks 20,0 (-)48° - (-)65°
8	Patchouli alkohol ($C_{15}H_{26}O$)	%	Min 30
9	Alpha copaene ($C_{15}H_{24}$)	%	Maks. 0,5
10	Kandungan besi (Fe)	mg/kg	Maks 25

Minyak nilam yang diperdagangkan seharusnya memenuhi spesifikasi seperti yang tercantum dalam Tabel 2.1. Akan tetapi mayoritas minyak nilam hasil penyulingan masyarakat masih memiliki kualitas yang rendah, yaitu memiliki kadar kemurnian di bawah 30% [17]. Kualitas dari minyak nilam dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah bibit yang baik, teknik budidaya yang tepat, umur panen yang cukup, persiapan bahan yang tepat sebelum penyulingan, dan teknik penyulingan. Penyulingan yang

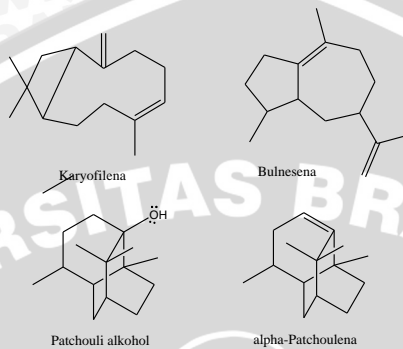
menghasilkan kualitas minyak nilam terbaik dilakukan dengan lama 5-7 jam. Persiapan nilam dilakukan dengan mencincang daun tanaman nilam yang berumur 6 bulan atau lebih dan dikeringkan [18].

Tabel 2.2: Data senyawa penyusun minyak nilam

No	Waktu Retensi (menit)	% area	Senyawa
1	6,589	0,12	α -pinena
2	2,626	0,37	β -pinena
3	15,708	3,65	α -gurjunena
4	16,267	4,27	Trans- β -karyofilena
5	16,463	16,13	α -guaiena
6	16,728	8,91	scychellena
7	16,913	7,92	α -patchoulena
8	17,012	1,75	Isofensil alcc
9	17,238	0,66	Eremofilena
10	17,335	3,53	β -kamigrena
11	17,470	19,37	δ -guaiena
12	17,770	0,17	Selina-3,7(11)-diena
13	18,409	0,79	Isopatchoulena
14	18,628	0,43	Karyofilena oksida
15	19,106	0,46	Palustrol
16	19,509	1,44	Globulol
17	19,788	29,40	Patchouli alkohol
18	20,140	0,36	δ -lakton
19	20,701	0,26	Antrasena

Hasil penelitian yang terlihat pada Tabel 2.2 berbeda dengan penelitian serupa yang lain [5]. Penelitian yang lain menunjukkan bahwa kandungan dalam minyak nilam adalah β -pinena(1%), β -patchoulena (12,12%), β -elemena (1,23%), β -karyofilena (3,89%), α -guaiena (20,62%), α -patchoulena (10,52%), β -kubenena(1,34%), α -selinena (4,17%), α -bulnesena (16,18%) dan patchouli alkohol (11,12%) [5]. Adanya perbedaan hasil penelitian dipengaruhi oleh waktu pengambilan dan tempat tumbuhnya tanaman nilam [5]. Struktur molekul dari beberapa kandungan minyak nilam yang

dimuat dalam Schmidt pada tahun 1998 [7] dapat dilihat dalam Gambar 2.1:



Gambar 2.1: Struktur molekul kandungan minyak nilam

Minyak nilam merupakan salah satu minyak atsiri yang diketahui memiliki aktivitas biologi sebagai agen alternatif pengontrol bakteri, jamur dan virus di dalam makanan, tanaman pertanian, manusia dan hewan. Monoterpenoid dan fenilpropanoid adalah kandungan utama dalam berbagai macam minyak atsiri. Aktivitas antivirus dan antijamur pada minyak atsiri berpotensi untuk menjadi obat sintetik alternatif penyakit pada manusia [3]. Selain itu, minyak nilam memiliki aktivitas antibakteri [4] dan antiinflamasi [5].

2.2 Patchouli Alkohol

Patchouli alkohol disebut juga patchouli champor (Bulan, 2004). Nama IUPAC dari patchouli alkohol adalah oktahidro-4,8a,9,9-tetrametil-1,6-metano-1(2H)-naftol. Rumus molekulnya adalah $C_{15}H_{26}O$ dengan berat molekul 222,37 gram dan berat jenis 1,0284 [19].

Patchouli alkohol merupakan komponen utama minyak nilam yang jumlah kandungannya dalam minyak menentukan tingkat mutu dan harga minyak nilam. Metode yang direkomendasikan oleh ISO 3757/2002 adalah metode kromatografi gas [20]. Patchouli alkohol merupakan senyawa seskuiterpen alkohol tersier trisiklik, tidak larut dalam air, larut dalam alkohol, eter atau pelarut organik

yang lain, mampu mendidih pada suhu 140°C pada tekanan 8 mmHg dan kristal yang terbentuk memiliki titik leleh 56°C [11].

Patchouli alkohol merupakan komponen yang memiliki titik didih relatif tinggi dalam minyak nilam selain senyawa golongan terpen. Titik didih yang relatif tinggi tersebut menyebabkan minyak nilam memiliki sifat fiksatif, yaitu sebagai pengikat senyawa atsiri lainnya, sehingga titik didih senyawa atsiri yang relatif rendah jika dicampur dengan minyak nilam akan menaikkan titik didih campurannya. Selain itu, patchouli alkohol juga menyebabkan aroma pada minyak atsiri yang dicampurkan tidak mudah menguap sehingga minyak nilam dapat digunakan sebagai pengikat bau (aroma) pada produk-produk parfum atau kosmetik [20].

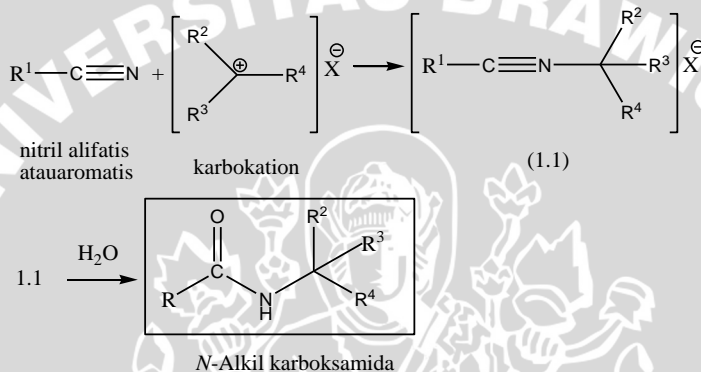
2.3 Distilasi dengan Pengurangan Tekanan

Distilasi merupakan metode untuk memisahkan beberapa senyawa dalam campuran yang mudah menguap dan memiliki perbedaan titik didih. Senyawa pada campuran yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu dan akan mencair lagi menjadi distilat dan dikumpulkan hingga suhu uap tertentu. Jika suhu uap meningkat maka komponen yang titik didihnya lebih tinggi akan terdistilasi dan dikumpulkan menjadi fraksi yang berbeda [21].

Fase uap setelah dikondensasikan dalam kondensor disebut sebagai distilat sedangkan sisa cairannya disebut residu. Distilat mengandung lebih banyak komponen yang volatil (mudah menguap) dan residu mengandung lebih banyak komponen yang kurang volatil. Penggunaan distilasi dapat menghasilkan distilat yang lebih murni, sedangkan proses dalam keadaan vakum ditujukan untuk menjaga agar suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi sehingga mencegah kerusakan atau dekomposisi bahan akibat panas yang terlalu tinggi dan lama. Prinsip dari distilasi adalah pemisahan berdasarkan perbedaan tekanan uap senyawa-senyawa dalam campuran. Keunggulan dari distilasi yaitu menghasilkan pemisahan yang memiliki kemurnian yang cukup tinggi, relatif murah karena tidak membutuhkan tambahan bahan lain seperti pelarut dan gas [10].

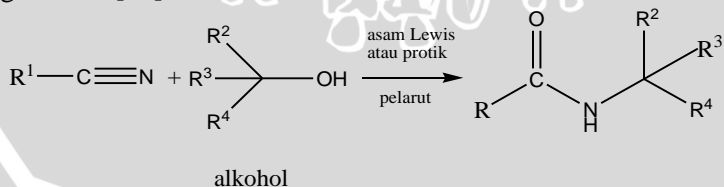
2.4 Reaksi Ritter

Reaksi *Ritter* diprakarsai oleh J.J Ritter dan P.P Minieri pada tahun 1948 yang berhasil mereaksikan nitril dengan alkena atau alkohol tersier dalam kondisi asam membentuk *N-tert*-alkilamida. Secara umum, reaksi *Ritter* merupakan reaksi untuk sintesis amida (*N*-alkil karboksamida) dari nitril alifatis atau aromatis dan karbokation dalam media asam kuat. Reaksinya dapat dilihat pada Gambar 2.2 [13].



Gambar 2.2: Reaksi *Ritter* secara umum

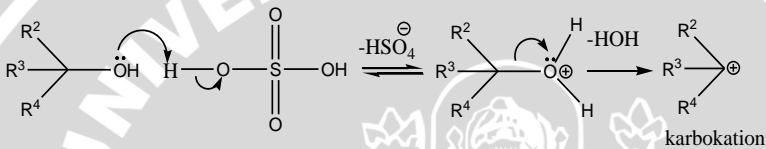
Reaksi *Ritter* akan memberikan hasil yang baik untuk alkohol yang mudah terionisasi seperti alkohol sekunder, tersier dan benzil alkohol. Reaksi *Ritter* dengan alkohol ditunjukkan pada Gambar 2.3. Hal yang perlu diperhatikan pula bahwa pembentukan karbokation yang memiliki banyak gugus fungsi yang berbeda memungkinkan terjadinya penataan ulang *Wagner-Meerwein* untuk menghasilkan karbokation yang paling stabil sebelum bereaksi dengan nitril [13].



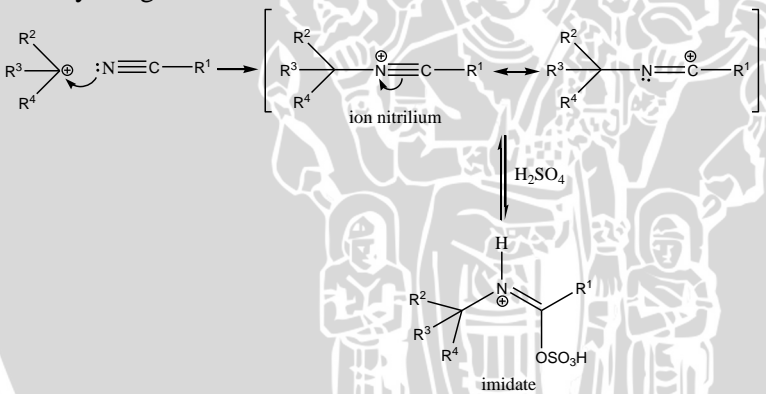
Gambar 2.3: Reaksi *Ritter* dengan alkohol

Mekanisme dari reaksi *Ritter* dimulai dengan alkohol yang membentuk suatu karbokation. Pembentukan karbokation ini disebabkan karena gugus hidroksil menyerang proton dari asam sehingga akibat reaksi ini ikatan C-O terbelah secara heterolitik membentuk karbokation. Kation ini kemudian diserang oleh atom nitrogen dari nitril membentuk *nitrilium imidate*. Pada akhirnya, terjadi hidrolisis sehingga terbentuk *N*-alkil karboksamida. Adapun tahapan dari mekanisme reaksi *Ritter* adalah sebagai berikut [13]:

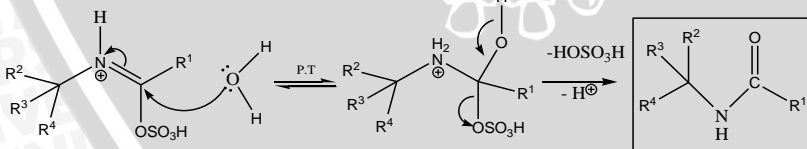
1. Pembentukan karbokation



2. Penyerangan karbokation oleh nitril



3. Pembentukan amida



Gambar 2.4: Mekanisme reaksi *Ritter* secara umum

2.5 Analisis dengan *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FTIR)

Analisis inframerah dipelajari berdasarkan serapan (atau pantulan) radiasi elektromagnetik yang berkisar pada panjang gelombang 1-1000 μm . Spektrometer IR merupakan salah satu spektrometer yang umum digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa dan menghitung konsentrasi beberapa sampel. Setiap molekul memiliki banyak ikatan dan masing-masing ikatan akan memiliki mode vibrasi IR aktif yang berbeda. Hal inilah yang dijadikan dasar pada analisis spektrometer IR [22].

Pada umumnya, spektrometer IR menggunakan berkas ganda. Model instrumen yang menggunakan berkas tunggal dijumpai pada *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FTIR). Komponen yang penting dalam FTIR yang membedakan dengan spektrometer IR adalah sebuah interferometer yang terletak antara sumber cahaya dan sampel sehingga tidak adanya monokromator. Rancangan alat pada FTIR lebih rumit dibanding dengan spektrometer yang menggunakan berkas ganda akan tetapi spektrum yang dihasilkan lebih akurat [22].

Tabel 2.3: Spektrum IR beberapa gugus fungsional molekul organik

Gugus Fungsional	Range Frekuensi (cm^{-1})	Jenis Vibrasi
Alkohol tersier (-CR ₂ OH)	3620-3610 1160-1120	Regangan O-H Regangan C-OH
Aromatik	3100-3000 1630-1430	Regangan CH Regangan cincin aromatis
Metil (-CH ₃)	2970-2830	Regangan CH dalam C-CH ₃
Amida Sekunder (-CONHR)	3300-3280 1680-1640 1560-1530 1310-1290	Regangan NH Regangan C=O Bengkokan NH Regangan C-N

Spektrometer FTIR dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Namun pada umumnya, spektrometer IR hanya

digunakan untuk analisis kualitatif karena sirkuit elektronik yang rumit menyebabkan hasil analisis kuantitatif tidak akurat. Pada keperluan kuantitatif diperlukan adanya internal standar [23]. Berkaitan dengan karakterisasi hasil sintesis dari penelitian ini, maka diperlukan data dari Tabel 2.3 [24].

2.6 Analisis dengan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa (KG-SM)

Kromatografi Gas – Spektrometer Massa (KG-SM) merupakan gabungan dua sistem antara kromatografi gas dan spektrometer massa dengan prinsip dasar yang berbeda satu sama lain tetapi dapat saling melengkapi. Pada alat KG-SM ini, kedua alat dihubungkan dengan suatu *interface*. Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah terpisahkan oleh kromatografi gas [25].

Analisis dengan KG-SM merupakan metode yang cepat dan akurat untuk memisahkan campuran yang rumit, mampu menganalisis cuplikan dalam jumlah sangat kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur serta identitas senyawa organik [25]. Selain untuk analisis kualitatif, spektrum massa dipakai untuk penentuan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif yaitu spektrometri massa dapat digunakan untuk menentukan berat molekul atau rumus molekul atau mengidentifikasi dari pola fragmentasinya. Analisis kuantitatif yaitu digunakan untuk mengenali sifat-sifat dari suatu senyawa [26].

Penggunaan KG-SM akan diperoleh dua informasi dasar, yaitu *Total Ionic Chromatogram* (TIC) hasil analisis dari kromatografi gas dan spektrum massa hasil analisis spektrometer massa. Kromatogram digunakan untuk analisis secara kuantitatif karena jumlah puncak yang terbentuk dalam kromatogram menunjukkan jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang dianalisis. Selain itu, luas dari puncak menunjukkan konsentrasi komponen. Spektrum massa lebih menunjukkan analisis secara kualitatif. Hal ini karena spektrum massa menggambarkan jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu

komponen kimia. Setiap fragmen merupakan hasil pemecahan dari suatu komponen kimia yang memiliki berat molekul yang berbeda. Pola fragmentasi (pemecahan) inilah yang dijadikan patokan untuk menentukan struktur molekul suatu komponen kimia. Selanjutnya, spektrum massa hasil analisis dibandingkan dengan spektrum massa dari suatu bank data untuk dilakukan identifikasi senyawa [25].

2.7 Uji Toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test*

Bioaktivitas dari suatu ekstrak dapat diketahui melalui daya bunuh *in vivo* senyawa terhadap organisme hewan sehingga uji toksisitas dapat digunakan untuk menapis suatu senyawa bioaktif dari ekstrak. Pada farmakologi, hampir seluruh senyawa bioaktif selalu toksik pada dosis tinggi. *Artemia salina* Leach merupakan organisme hewan yang sesuai untuk keperluan uji toksisitas [14]. Hal ini dikarenakan telur *A. salina* memiliki daya tahan yang tinggi dan memiliki masa penetasan yang cepat yaitu 48 jam [27].

Hasil dari metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dinyatakan dengan nilai *Lethality Concentration* 50 (LC_{50}) dalam $\mu\text{g/mL}$. Nilai LC_{50} adalah angka yang menunjukkan konsentrasi senyawa dimana jumlah *A. salina* mati sebesar 50%. Keuntungan dari metode ini adalah cepat, murah, mudah dikerjakan, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya [15].

Menurut metode Mayer, uji dengan BSLT dilakukan dengan memasukkan sebanyak 10 larva udang dalam 100 μL air laut ke dalam vial uji, kemudian ditambahkan 100 μL larutan sampel. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan dengan 100 μL larutan blanko kemudian ditambahkan air laut hingga 200 μL . Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva udang yang masih hidup dan yang sudah mati [15]. Nilai LC_{50} ditentukan dengan analisa regresi [29]. Kriteria tingkat toksisitas ditentukan berdasarkan Deciga-campos, dkk [29].

Tabel 2.4: Kriteria toksisitas

Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Kriteria
> 1000	tidak toksik
500-1000	toksik lemah
< 500	toksik

2.8 *Artemia salina* Leach.

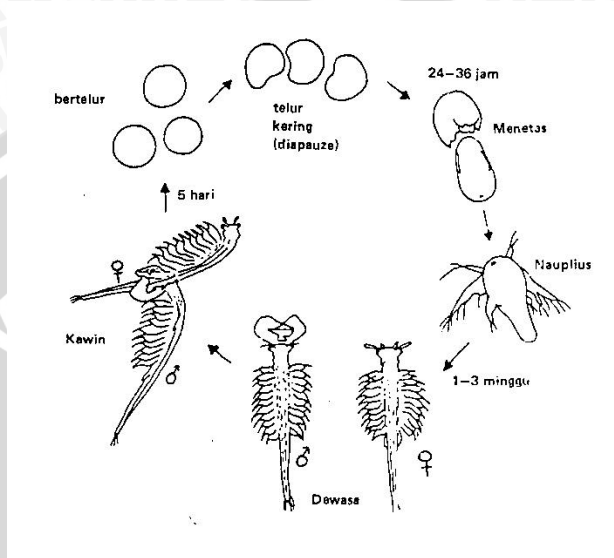
Artemia salina atau *brine shrimp* adalah sejenis udang primitif. Udang ini sering digunakan sebagai hewan uji dalam metode BSLT. Menurut Mujiman, pada mulanya *A.salina* memiliki nama spesies *Cancer Salinus* Linnaeus yang kemudian diubah menjadi *Artemia salina* oleh Leach. Adapun klasifikasi dari *A.salina* adalah sebagai berikut [30]:

Subkingdom : Metazoa
Phylum : Arthropoda
Subphylum : Mandibulata
Classis : Crustaceae
Subclassis : Branchiopoda
Ordo : Anostraca
Famili : Artemiidae
Genus : Artemia
Spesies : *Artemia salina* Leach

A.salina yang diperdangkan dalam bentuk telur istirahat disebut dengan kista, berbentuk bulat-bulatan kecil antara 200-350 mikron dengan warna kelabu kecoklatan. Satu gram kista *A.salina* kering rata-rata terdiri atas 200.000-300.000 butir kista. Kista *A.salina* ini mampu menetas sekitar 18-24 jam apabila kondisi air laut memiliki salinitas 5-70 permil [31]. Selama penetasan kista *A.salina*, suhu air dikondisikan antara 25-30°C sehingga perlu dilakukan penyinaran dengan lampu di samping wadah. Selain itu, kadar oksigen harus lebih dari 2 mg/L yang dapat dicapai dengan bantuan aerator [30].

A.salina memiliki beberapa tahapan pada proses penetasan (yang dapat dilihat pada Gambar 2.5) yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang, dan tahap payung atau tahap pengeluaran [30]. Pada tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Setelah menyerap air, maka kista akan mulai memecah cangkangnya dan kemudian anak *A.salina* akan keluar pada tahap payung. Telur *A.salina* yang baru menetas disebut dengan nauplius yang berwarna orange dan berbentuk lonjong dengan

panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron, dan berat 0,002 mg [31].



Gambar 2.5: Tahap penetasan *Artemia salina* Leach

2.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah reaksi Ritter antara benzonitril dengan patchouli alkohol menghasilkan senyawa organonitrogen aromatik. Senyawa hasil sintesis ini diduga memiliki nilai LC_{50} yang rendah, dimana senyawa tersebut memiliki toksisitas yang tinggi terhadap *Artemia salina* Leach.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Analisis sampel dan hasil sintesis dengan KG-SM dilakukan di Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Analisis dengan FT-IR dilakukan di Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Pelaksanaan penelitian ini adalah pada bulan Oktober-Desember 2011.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Sampel

Minyak nilam yang digunakan untuk penelitian merupakan minyak nilam perdagangan yang diperoleh dari wilayah Kabupaten Blitar.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat pro analis (pa) kecuali jika disebut lain: asam sulfat (H_2SO_4) pekat, natrium bikarbonat (NaHCO_3) jenuh, dietil eter, telur *A.salina*, benzonitril, air laut, aquades, natrium sulfat anhidrat, natrium klorida (NaCl), dimetil sulfoksida (DMSO) dan gas nitrogen (N_2).

3.2.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, seperangkat alat distilasi farksinasi dengan pengurang tekanan (pompa vakum), seperangkat alat refluks, pengaduk magnet, seperangkat alat KG-SM Shimadzu GCMS-QP2010S Shimadzu, dan seperangkat spektrofotometer FTIR Shimadzu 8400S.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi *starting material* patchouli alkohol dengan distilasi pengurangan tekanan
2. Sintesis senyawa organonitrogen aromatik melalui reaksi *Ritter*
3. Analisis senyawa hasil sintesis
4. Uji toksisitas senyawa hasil sintesis dengan BSLT
5. Analisis data

3.4 Metode Kerja

3.4.1 Preparasi *starting material* patchouli alkohol dengan distilasi pengurangan tekanan

Sebanyak 75 mL minyak nilam perdagangan yang telah dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat dimasukkan ke labu alas bulat kapasitas 100 mL dan disiapkan dalam rangkaian alat distilasi dengan kolom 30 cm dan kondensor 60 cm. Selanjutnya dilakukan distilasi fraksinasi dengan pengurangan tekanan. Pemanasan dilakukan dengan penangas minyak selama ± 6 jam. Residu yang diperoleh dikarakterisasi dengan FTIR dan dianalisis tingkat kemurniannya dengan KG-SM.

3.4.2 Sintesis senyawa organonitrogen aromatik melalui reaksi *Ritter*

Patchouli alkohol 22,2 gram (0,1 mol) dimasukkan ke dalam labu alas bulat 100 ml dan ditambahkan benzonitril sebanyak 15,465 g (15,43 mL, 0,15 mol). Campuran ini didinginkan terlebih dahulu hingga 0°C lalu ditambahkan 22 mL H_2SO_4 tetes demi tetes. Setelah H_2SO_4 habis, reaksi dilakukan pada suhu kamar dan dibiarkan selama 24 jam sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Selanjutnya dilarutkan dalam 100 mL dietil eter dan ditambahkan ke dalam air es sebanyak 100 mL lalu dimasukkan dalam corong pisah. Fase organik yang masih tersisa dalam fase air diekstrak kembali dengan 100 mL dietil eter. Fase organik yang diperoleh dikumpulkan dan dinetralkan dengan NaHCO_3 jenuh dilanjutkan dengan pencucian menggunakan aquades dan NaCl sebanyak 20 mL. Filtrat yang diperoleh

dikumpulkan dan dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat kemudian disaring. Sisa pelarut dihilangkan dengan gas N_2 dan dianalisis dengan KG-SM dan FT-IR.

3.4.3 Analisis senyawa hasil sintesis

3.4.3.1 Analisis dengan FTIR

Hasil sintesis dianalisis dengan FTIR untuk memperoleh data dalam prediksi gugus fungsi. Adapun spesifikasi dari FTIR adalah:

Tipe alat	: Shimadzu 8400S
Interferometer	: Tipe Michelson
Sistem optik	: Sinar tunggal
S/N	: Keramik globular
Medium sampel	: pellet KBr

3.4.3.2 Analisis dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM)

Analisis senyawa hasil sintesis dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM) GCMS-QP2010S SHIMADZU dengan tipe dan kondisi operasional alat adalah:

Jenis kolom	: Rtx-Wax
Jenis detektor	: FTD
Panjang kolom	: 30 meter
Suhu kolom	: $100\text{ }^\circ\text{C} - 250\text{ }^\circ\text{C}$ ($5\text{ }^\circ\text{C}/\text{menit}$)
Suhu injektor	: $250\text{ }^\circ\text{C}$
Suhu detektor	: $250\text{ }^\circ\text{C}$
Gas pembawa	: He ($0,5\text{ ml}/\text{menit}$)
Jenis pengion	: EI (Electron Impact) 70 eV

Data berupa kromatogram berupa *Total Ion Chromatogram* (TIC) dan spektrum massa, dimana TIC digunakan untuk menentukan jumlah dan kadar komponen hasil sintesis sedangkan spektrum massa digunakan untuk menentukan jenis atau struktur komponen hasil sintesis

3.4.4 Uji toksisitas senyawa dengan BSLT

3.4.4.1 Penetasan telur *A. salina*

Telur *A.salina* sebanyak 0,03 g direndam dengan 1 L air laut di dalam suatu wadah. Wadah ini diterangi dengan lampu dengan meletakkannya di samping wadah untuk menghangatkan suhu dalam penetasan. Setelah 48 jam perendaman, telur menetas dan menghasilkan larva yang dapat digunakan untuk pelaksanaan uji.

3.4.4.2 Preparasi larutan uji

Pada penelitian ini, baik patchouli alkohol dan senyawa hasil sintesis diuji dengan BSLT agar dapat diketahui peningkatan aktivitas senyawa hasil sintesis dengan patchouli alkohol. Senyawa yang akan diujikan dibuat dalam konsentrasi 10,25,50,75,100,125 dan 150 ppm dalam air laut. Agar senyawa larut dalam air laut, maka ditambahkan DMSO sebanyak 1% dari total larutan dan dilakukan pengocokan sampai semua sampel larut.

3.4.4.3 Pelaksanaan uji

Sampel uji sebanyak 5 ml, dengan konsentrasi 10,25,50,75,100,125 dan 150 ppm yang telah dibuat dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda. Lalu dimasukkan 10 ekor larva udang. Setiap konsentrasi dilakukan hingga 3 kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan hidup pada tiap konsentrasi. Perhitungan mortalitas dilakukan dengan persamaan di bawah ini [28]:

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva total}} \times 100\%$$

3.4.5 Metode analisis data

Data berupa kromatogram, spektrum massa dan IR dianalisis secara deskriptif untuk menentukan analisa secara kualitatif maupun kuantitatif, yaitu identifikasi struktur molekul hasil sintesis dan

presentase hasilnya. Data-data dari uji toksisitas dengan BSLT dianalisa memakai persamaan regresi linear $y=ax$, dimana y adalah mortalitas dan x adalah konsentrasi sehingga didapatkan nilai LC_{50} yang digunakan untuk mengetahui informasi tentang potensi senyawa hasil sintesis.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

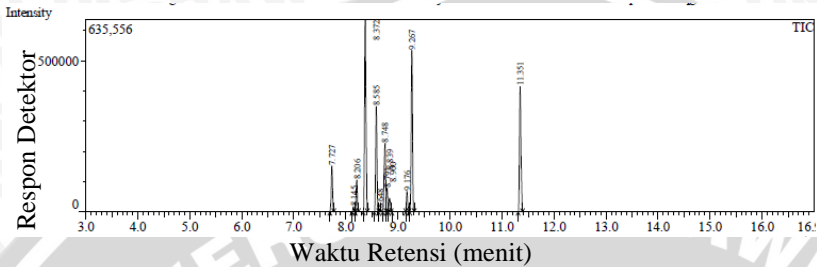
4.1 Isolasi Patchouli Alkohol dari Minyak Nilam

Pada umumnya, patchouli alkohol merupakan komponen utama penyusun dalam minyak nilam. Minyak nilam adalah minyak yang diperoleh dengan cara penyulingan uap dari daun tanaman *Pogestemon cablin* BENTH [16]. Metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui adanya patchouli alkohol dalam minyak nilam dapat menggunakan metode yang direkomendasikan oleh ISO 3757/2002 [20], yaitu metode kromatografi gas.

Kromatografi gas dapat dihubungkan dengan spektrometer massa. Gabungan antara kedua sistem ini dinamakan dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM). Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah terpisahkan oleh kromatografi gas [26]. Dengan demikian, akan didapatkan suatu *Total Ionic Chromatogram* (TIC) dan spektrum massa untuk keperluan identifikasi. Kromatogram digunakan untuk mengetahui kuantitas komponen minyak nilam sedangkan spektrum massa digunakan untuk menentukan komponen penyusun secara kualitatif.

Pada penelitian ini, patchouli alkohol digunakan sebagai *starting material* keperluan sintesis sehingga perlu diketahui kadar relatif patchouli alkohol dalam minyak nilam. Maka dari itu, minyak nilam perdagangan diidentifikasi menggunakan KG-SM. KG-SM dengan kolom pada kromatografi gas berupa kolom Rtx-5MS menghasilkan kromatogram minyak nilam perdagangan yang dapat dilihat pada Gambar 4.1. Berdasarkan kromatogram ini didapatkan pemisahan sebanyak 13 senyawa, waktu retensi dari masing-masing senyawa pada kromatogram minyak nilam perdagangan disajikan pada Tabel 4.1. Kolom Rtx-MS tersusun atas fase diam berupa 5% difenil dan 95% dimetil polisiloksan [32]. Fase diam ini memiliki karakter nonpolar sehingga senyawa yang polar akan terelusi terlebih dahulu. Helium digunakan sebagai gas pembawa. Tekanan sistem dan temperatur juga berpengaruh disamping interaksi antarfasa.

Senyawa dengan titik didih rendah cenderung terelusi lebih cepat dibandingkan dengan senyawa yang memiliki titik didih lebih tinggi.



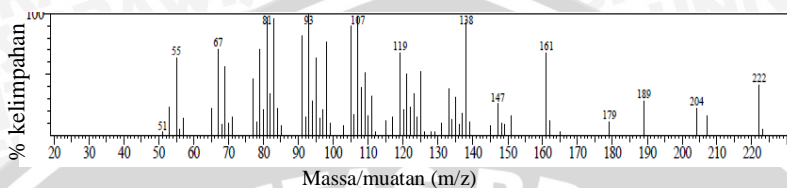
Gambar 4.1: Kromatogram minyak nilam sebelum distilasi

Tabel 4.1: Komponen penyusun minyak nilam sebelum dilakukan distilasi

No.	Waktu Retensi (menit)	% area
1.	7,727	5,56
2.	8,145	0,52
3.	8,206	3,72
4.	8,372	23,77
5.	8,585	13,27
6.	8,648	0,30
7.	8,748	9,13
8.	8,791	2,56
9.	8,839	1,60
10.	8,900	0,08
11.	9,176	2,38
12.	9,267	20,21
13.	11,351	16,91

Senyawa pada waktu retensi 11,351 menit memiliki spektrum massa seperti pada Gambar 4.2. Spektrum massa ini menunjukkan puncak dengan $m/z = 222, 204, 189, 179, 161, 147, 138, 119, 107, 93, 81, 67, 55$ dan 51. Spektrum massa ini memiliki

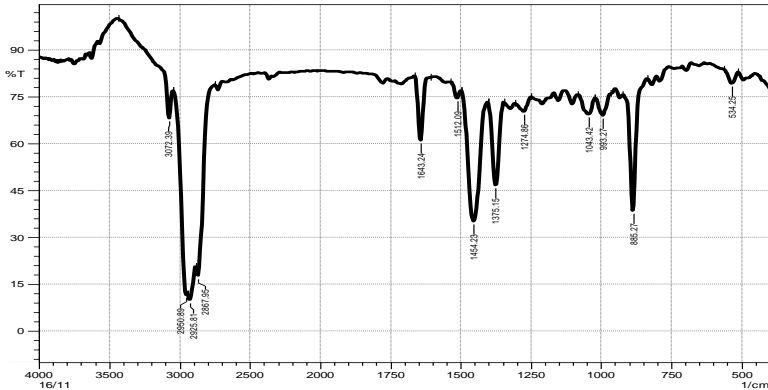
kemiripan spektrum massa dengan patchouli alkohol standar (Lampiran H).



Gambar 4.2: Spektrum massa senyawa dengan waktu retensi 17,914 menit

Berdasarkan kromatogram yang tercantum pada Gambar 4.1, kandungan patchouli alkohol dalam minyak nilam perdagangan adalah sebesar 16,91 %. Kandungan patchouli alkohol dalam minyak nilam ditingkatkan dengan distilasi pengurangan tekanan. Prinsip dari distilasi adalah pemisahan berdasarkan perbedaan tekanan uap senyawa-senyawa dalam campuran. Keunggulan dari distilasi yaitu menghasilkan pemisahan yang memiliki kemurnian yang cukup tinggi, relatif murah karena tidak membutuhkan tambahan bahan lain seperti pelarut dan gas [10]. Proses distilasi dengan pengurangan tekanan ditujukan untuk menjaga agar suhu yang digunakan tidak terlalu tinggi sehingga mencegah kerusakan atau dekomposisi bahan akibat panas yang terlalu tinggi dan lama karena titik didih patchouli alkohol yang sangat tinggi yaitu 287-288°C pada 760 mmHg [19].

Distilasi dilakukan menggunakan penangas minyak dengan suhu pemanasan sebesar 200°C dan tekanan mencapai 100 mmHg. Distilasi pada penelitian ini dimaksudkan untuk mengurangi komponen penyusun minyak nilam selain patchouli alkohol. Penyusun selain patchouli alkohol dalam minyak nilam merupakan senyawa alkena yang memiliki titik didih lebih rendah sehingga akan lebih mudah menguap dan tertampung sebagai distilat. Proses distilasi ini menghasilkan distilat pada suhu 30 °C. Distilat merupakan cairan berwarna kuning jernih. Spektrum IR dari distilat ini dapat dilihat pada Gambar 4.3. Spektrum ini diinterpretasi (pada Tabel 4.2) dengan merujuk pada literatur bahwa distilat ini mengandung senyawa alkena [24]. Senyawa alkena ditandai dengan adanya serapan dari regangan =CH₂ pada 3072,39 cm⁻¹, regangan C=C pada 1643,24 cm⁻¹ dan tekukan C-H pada 885,72 cm⁻¹.



Gambar 4.3: Spektrum IR distilat

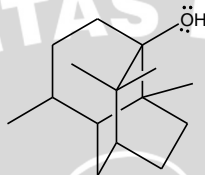
Tabel 4.2.: Data serapan IR dari distilat

Frekuensi (cm^{-1})	Jenis Vibrasi
3072,39	Regangan $=\text{CH}_2$ (alkena)
2925,81	Regangan C-H pada $-\text{CH}_2-$
1643,24	Regangan C=C (alkena)
1454,23	Tekukan C-H pada $-\text{CH}_2-$
1375,15	Tekukan CH_3 simetris (alkana)
885,27	Tekukan C-H (alkena)

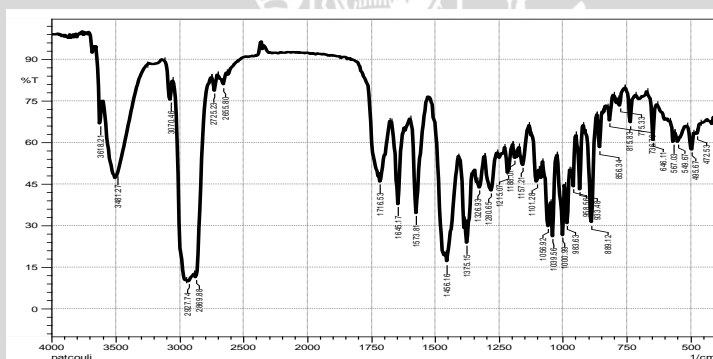
Sisa dari distilasi atau residu berupa cairan berwarna coklat kehitaman dan kental. Warna kehitaman ini disebabkan karena karamelisasi dari glukosa yang terkandung dalam minyak nilam. Residu pada umumnya mengandung komponen yang kurang volatil [10]. Patchouli alkohol sendiri merupakan senyawa yang memiliki titik didih sangat tinggi sehingga dapat diduga bahwa residu mengandung patchouli alkohol. Agar dapat dipastikan bahwa patchouli alkohol terdapat dalam residu, maka residu ini dianalisis dengan spektrofotometer IR yang menghasilkan spektrum pada Gambar 4.5.

Patchouli alkohol merupakan senyawa seskuiterpen alkohol tersier trisiklik yang strukturnya menurut Merck Index dapat dilihat pada Gambar 4.4 [11]. Identifikasi spektrum IR dan data serapan dari masing-masing puncak dituliskan pada Tabel 4.3. Serapan IR alkohol

tersier ditunjukkan adanya regangan O-H pada frekuensi 3618,21 cm^{-1} , tekukan dan regangan C-OH khas alkohol tersier pada frekuensi 1326,93 cm^{-1} dan 1188,07 cm^{-1} . Frekuensi 3481,27 cm^{-1} disebabkan karena adanya serapan OH dimerik. Serapan IR pada frekuensi 1375,15 cm^{-1} menunjukkan adanya CH_3 simetris. Akan tetapi, muncul serapan pada frekuensi 1645,17 cm^{-1} yang menunjukkan bahwa masih terdapat alkena di dalam residu.



Gambar 4.4: Struktur patchouli alkohol

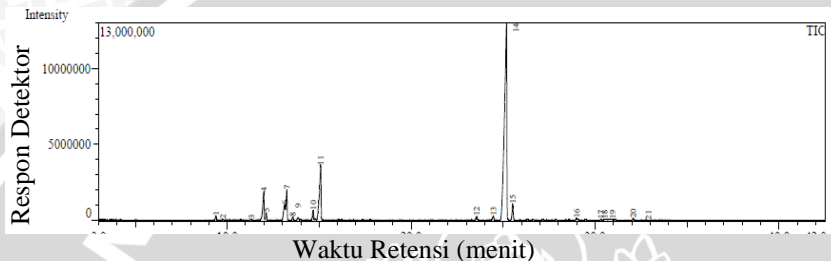


Gambar 4.5: Spektrum IR residu

Tabel 4.3: Data Serapan IR dari residu distilasi

Frekuensi (cm^{-1})	Jenis Vibrasi
3618,21	Regangan O-H pada alkohol tersier
3481,27	Regangan OH dimerik
2869	Regangan C-H pada $-\text{CH} <$
1645,17	Regangan C=C pada alkena
1375,15	Tekukan CH_3 simetris
1326,93	Tekukan OH pada alkohol tersier
1188,07	Regangan C-OH pada alkohol tersier

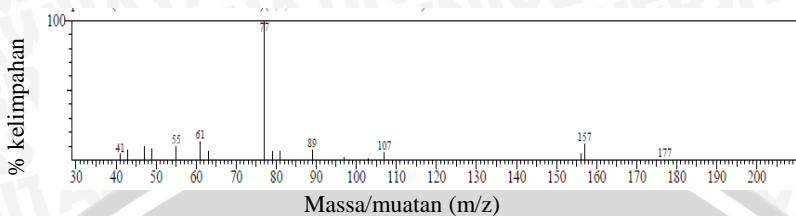
Pendugaan adanya patchouli alkohol dalam residu distilasi diperkuat dengan analisis menggunakan KGSM sehingga didapatkan kromatogram hasil distilasi pada Gambar 4.6. Kromatogram ini didapatkan dari kromatografi gas dengan kolom RTx-wax yang fase diamnya berupa polietilen glikol. Total kromatogram ionik yang terdeteksi ada 15 senyawa seperti tercantum pada Tabel 4.4.



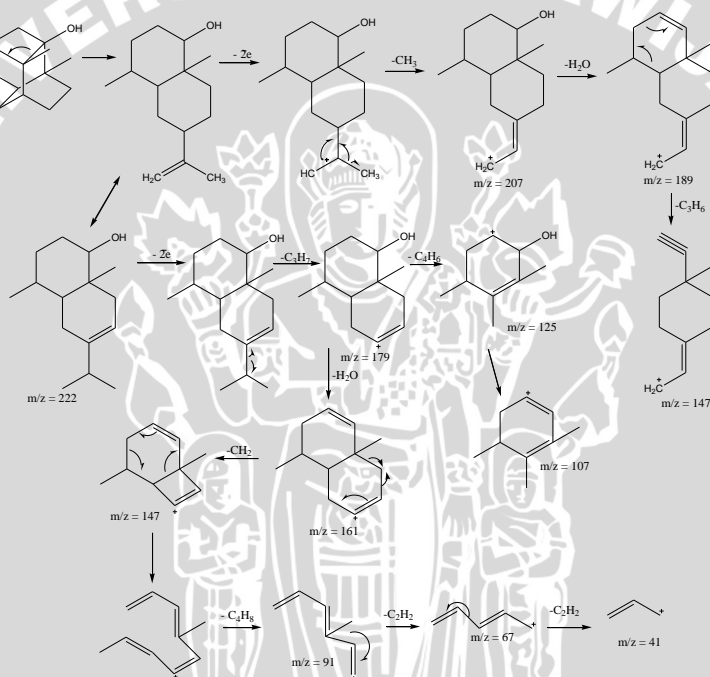
Gambar 4.6: Kromatogram minyak nilam dalam residu distilasi

Tabel 4.4: Komponen penyusun minyak nilam setelah dilakukan distilasi

No.	Waktu Retensi (menit)	% area
1.	9,392	0,59
2.	11,988	5,50
3.	12,119	0,97
4.	13,122	3,60
5.	13,238	4,64
6.	13,569	0,43
7.	13,580	0,45
8.	14,004	0,16
9.	14,672	1,61
10.	15,080	12,83
11.	23,565	0,58
12.	24,463	0,64
13.	25,172	65,25
14.	25,520	2,56
15.	29,009	0,20



Gambar 4.7: Spektrum massa senyawa dengan waktu retensi 25,172 menit



Gambar 4.8: Pola fragmentasi yang disarankan untuk patchouli alkohol

Senyawa pada waktu retensi 25,172 menit memiliki spektrum massa (Gambar 4.7) yang menghasilkan puncak pada $m/z = 222, 207, 189, 179, 161, 147, 138, 125, 98, 91, 79, 67, 43$ dan 41 . Spektrum massa ini memiliki kemiripan dengan spektrum massa patchouli alkohol standar (Lampiran H) dan memiliki kadar relatif

sebesar 65,25 %. Kadar relatif ini menunjukkan peningkatan kadar patchouli alkohol dalam minyak nilam dari sebelum distilasi dengan pengurangan tekanan. Puncak $m/z=222$ merupakan ion molekuler dari patchouli alkohol. Puncak $m/z=207$ disebabkan pelepasan gugus metil ($-CH_3$) dari ion molekuler $m/z=222$ yang akhirnya melepas H_2O menyebabkan puncak $m/z=189$. Puncak $m/z=189$ melepas $-C_3H_6$ membentuk puncak dengan $m/z=147$. Ion molekuler $m/z=222$ juga terfragmentasi melepas $-C_3H_7$ menjadi $m/z=179$ dilanjutkan dengan melepas $-C_4H_6$ menjadi $m/z=125$. Puncak $m/z=107$ disebabkan karena puncak pada $m/z=125$ melepaskan H_2O . Puncak $m/z=179$ juga melepaskan H_2O menjadi puncak $m/z=161$ dan selanjutnya melepas $-CH_2$ menjadi puncak $m/z=147$. Puncak $m/z=91$ merupakan puncak dasar yang disebabkan karena pelepasan $-C_4H_8$ dari puncak $m/z=91$. Puncak $m/z=91$ ini melepaskan $-C_2H_2$ menjadi puncak $m/z=67$ dan selanjutnya terjadi pelepasan $-C_2H_2$ lagi menjadi puncak $m/z=41$. Adapun pola fragmentasi senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 4.8.

4.2 Sintesis Senyawa Organonitrogen Aromatik dengan Reaksi Ritter

Reaksi *Ritter* adalah reaksi antara suatu karbokation dengan nitril alifatis atau aromatis dengan katalis asam kuat [13]. Karbokation dapat dibentuk dari suatu alkohol seperti patchouli alkohol. Nitril yang digunakan pada penelitian ini adalah nitril aromatis, yaitu benzonitril. Reaksi *Ritter* merupakan reaksi yang dapat digunakan untuk mensintesis senyawa amida.

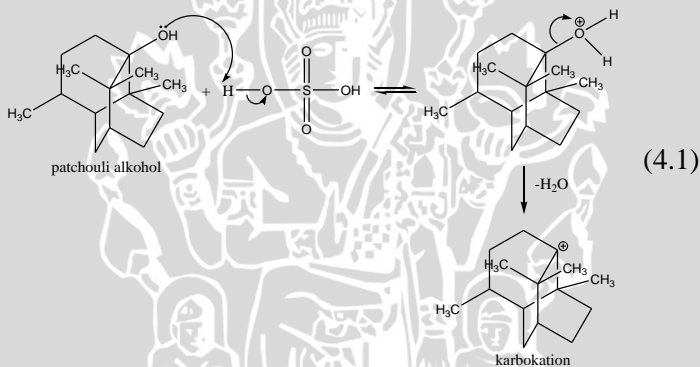
Reaksi Ritter dilakukan dengan 28,23 mL residu distilasi minyak nilam setara dengan patchouli alkohol 0,1 mol dan benzonitril sebanyak 15,32 mL yang setara dengan 0,15 mol, yang kemudian ditambahkan dengan 0,4 mol katalis H_2SO_4 . Perbandingan mol yang digunakan ini mengacu pada penelitian yang telah dilaporkan, reaksi *Ritter* dari α -olefins [33]. Katalis H_2SO_4 yang berlebih dimaksudkan agar memberikan hasil yang maksimal. Penambahan H_2SO_4 dilakukan setelah suhu campuran mencapai $0^\circ C$ untuk menghindari peningkatan suhu yang terlalu cepat karena reaksi yang terjadi bersifat eksotermis. Setelah reaksi berjalan selama 24 jam, campuran yang terbentuk berupa cairan kental berwarna coklat kehitaman yang pekat. Cairan ini diekstraksi dengan dietil eter dan

dicuci dengan NaHCO_3 untuk menetralkan asam. Senyawa hasil sintesis dikeringkan dari air menggunakan Na_2SO_4 anhidrat dan kemudian sisa pelarut dihilangkan dengan aliran gas N_2 .

Mekanisme pembentukan senyawa organonitrogen aromatik melalui tiga tahap dan ditunjukkan pada persamaan (4.1) sampai (4.3):

a. Pembentukan karbokation

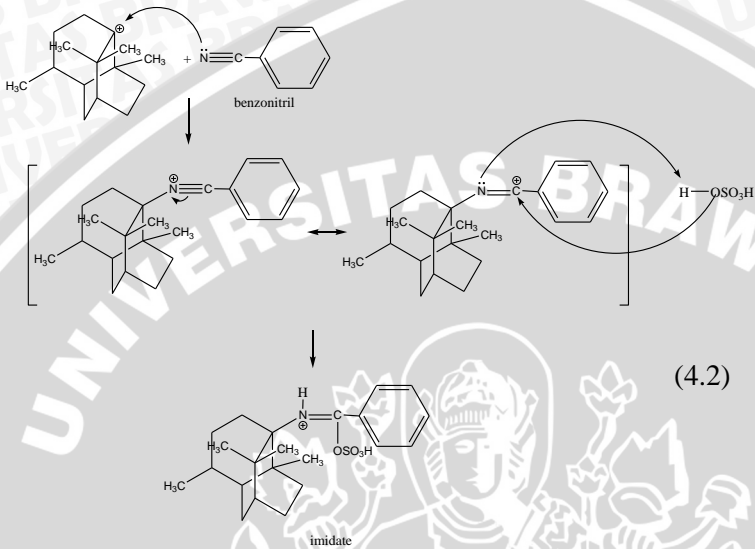
Adanya asam akan menyebabkan patchouli alkohol terdehidrasi membentuk karbokation. Seperti pada golongan alkohol, reaksi antara patchouli alkohol dengan H_2SO_4 merupakan reaksi eliminasi [34]. Karbokation yang dibentuk oleh alkohol tersier merupakan karbokation yang stabil sehingga tidak terjadi penataan ulang.



b. Penyerangan karbokation oleh benzonitril

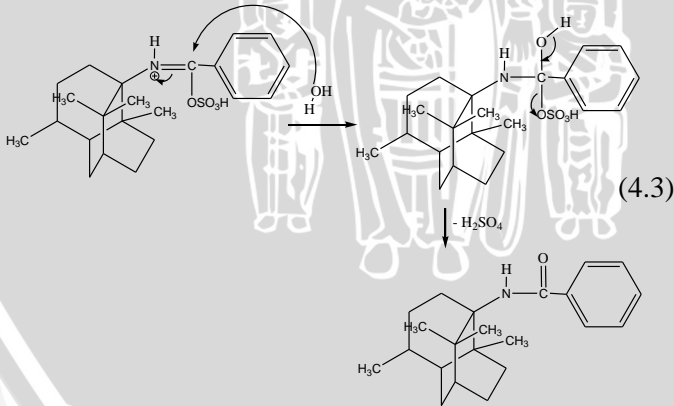
Setelah karbokation diserang oleh benzonitril, akan terbentuk ion nitrilium. Benzonitril merupakan senyawa aromatik, senyawa yang memiliki kestabilan akibat adanya delokalisasi elektron π [34]. Gugus $-\text{CN}$ pada benzonitril menyebabkan benzonitril merupakan nukleofil kuat. Atom nitrogen (N) bersifat elektronegatif dan memiliki pasangan elektron bebas sehingga akan memberikan efek induksi negatif dan resonansi negatif. Efek induksi dan resonansi ini menyebabkan awan elektron cenderung berkumpul di atom N, maka dari itu penyerangan terhadap karbokation

menyebabkan atom N yang akan berikatan dengan karbon yang bermuatan positif.

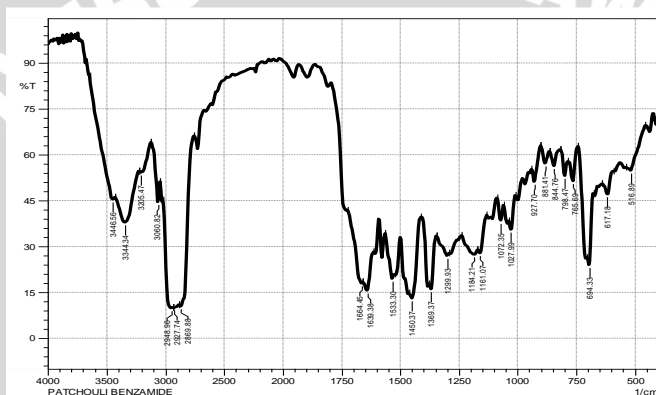


c. Pembentukan patchouli benzamida

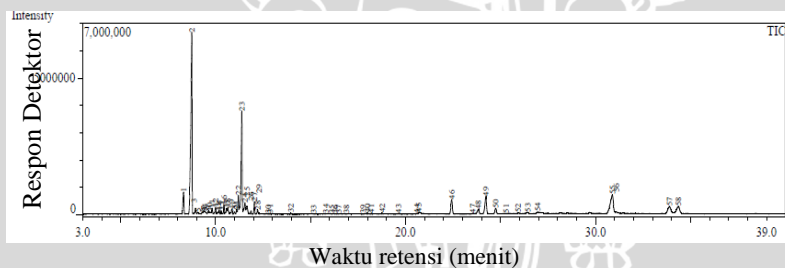
Imidate yang terbentuk akan terhidrolisis oleh air sehingga mengalami tautomerisasi membentuk amida.



Keberhasilan sintesis pada penelitian ditentukan dengan analisis spektrofotometer IR dan KGSM. Berdasarkan hasil analisis dengan spektrofotometer IR, spektrum IR (Gambar 4.9) yang didapat dapat diinterpretasikan bahwa ada senyawa amida. Serapan khas amida ditandai dengan munculnya spektra pada frekuensi 3.344,34 cm^{-1} dari regangan NH amida sekunder, 1.639,88 cm^{-1} dari regangan C=O, 1.533 cm^{-1} dari tekukan NH dan 1299,93 cm^{-1} dari regangan C-N. Selain itu juga terdapat serapan pada frekuensi 694,33 cm^{-1} yang merupakan serapan akibat tekukan CH aromatik.



Gambar 4.9: Spektrum IR senyawa hasil sintesis



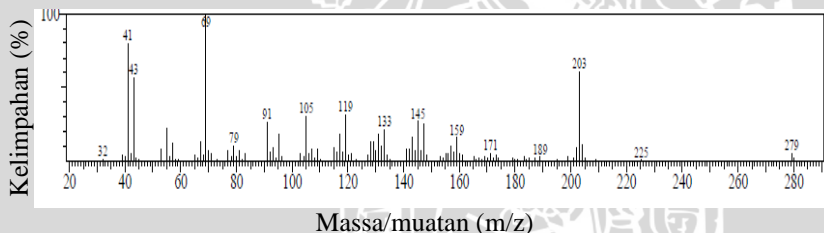
Gambar 4.10: Kromatogram campuran hasil sintesis

Berdasarkan analisis dengan KG-SM menggunakan kolom RTx-wax, hasil sintesis menunjukkan kromatogram seperti pada Gambar 4.10. Kromatogram ini menunjukkan adanya 7 komponen yang memiliki kadar relatif lebih dari 1% dan data disajikan pada

Tabel 4.5. Senyawa patchouli benzamida hasil sintesis diduga muncul pada waktu retensi 30,879 menit dengan kadar relatif sebesar 9,21%. Kadar relatif pada total kromatogram ionik ini dapat digunakan untuk menghitung yield sintesis (Lampiran D), yield yang didapatkan sebesar 5,48 %.

Tabel 4.5: Komponen penyusun campuran hasil sintesis

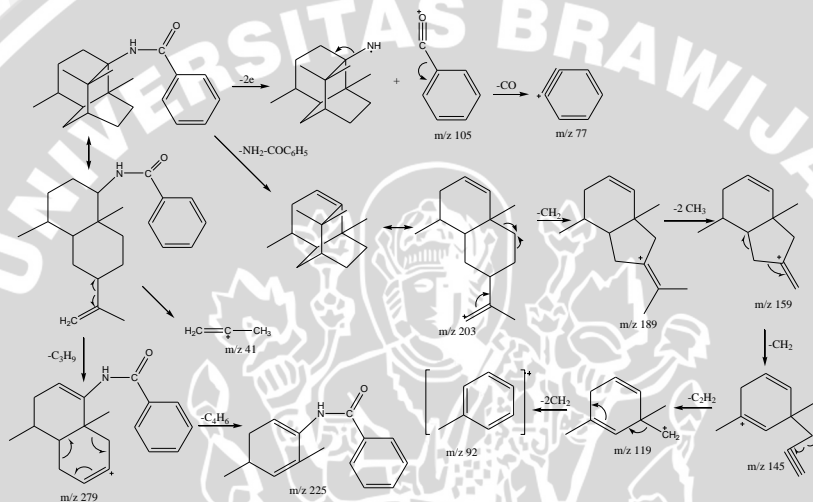
No.	Waktu Retensi (menit)	% area
1.	8,312	4,03
2.	8,748	41,08
3.	11,198	17,78
4.	12,039	1,63
5.	23,830	1,12
6.	24,225	4,78
7.	30,879	9,21



Gambar 4.11: Spektrum massa senyawa penyusun hasil sintesis dengan waktu retensi 30,879 menit

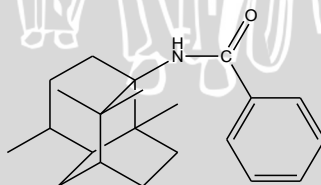
Spektrum massa dari senyawa patchouli benzamida (Gambar 4.11) menunjukkan puncak dengan $m/z = 279, 225, 203, 189, 171, 159, 145, 133, 119, 105, 91, 77, 69, 43, 41$ dan 32. Ion molekul dengan $m/z=325$ tidak terdeteksi pada detektor. Puncak $m/z=279$ disebabkan karena pelepasan $-C_3H_7$ pada molekul dan selanjutnya melepas $-C_4H_6$ membentuk puncak $m/z=225$. Saat ditembakkan elektron, molekul juga terbelah secara homolitik membentuk ion netral dan puncak $m/z=105$. Puncak $m/z=105$ ini melepas CO sehingga terbentuk puncak $m/z=77$. Molekul juga melepaskan $NH_2COC_6H_5$ sehingga membentuk puncak $m/z=203$. Puncak

$m/z=203$ melepaskan $-CH_2$ dan diikuti pelepasan $-CH_3$ dua kali sehingga terbentuk puncak $m/z=189$ dan $m/z=159$. Puncak $m/z=159$ melepaskan $-CH_2$ membentuk $m/z=145$ sehingga akhirnya $-C_2H_2$ terlepas membentuk $m/z=119$. Puncak $m/z=92$ terjadi karena puncak $m/z=119$ melepaskan $-CH_2$ sebanyak dua kali. Adapun pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa patchouli benzamida ini dapat dilihat pada Gambar 4.12.

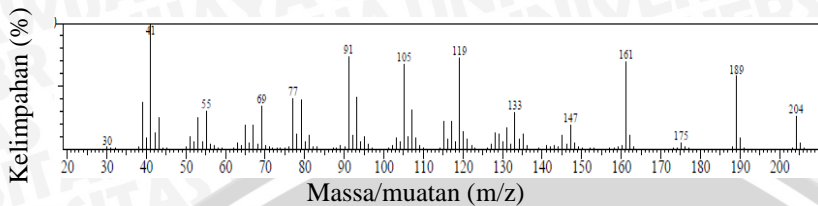


Gambar 4.12: Pola fragmentasi yang disarankan untuk patchouli benzamida

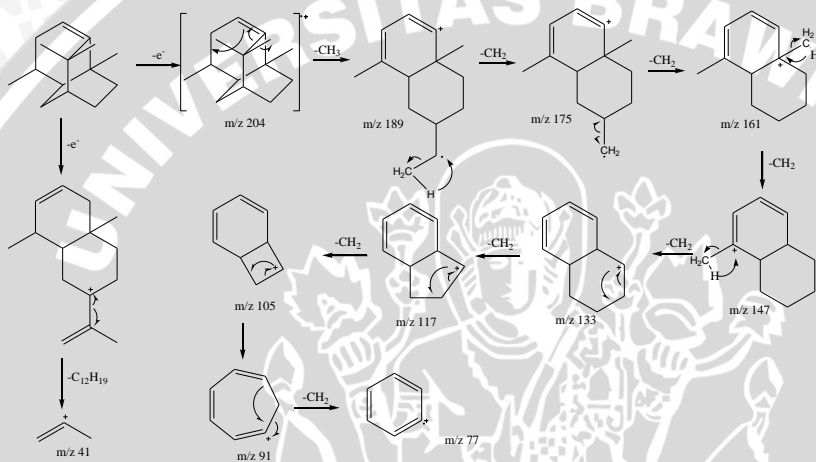
Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.13, dapat diduga struktur dari patchouli benzamida seperti pada gambar 4.13.



Gambar 4.13: Pendugaan struktur patchouli benzamida



Gambar 4.14: Spektrum massa senyawa penyusun hasil sintesis dengan waktu retensi 8,748 menit

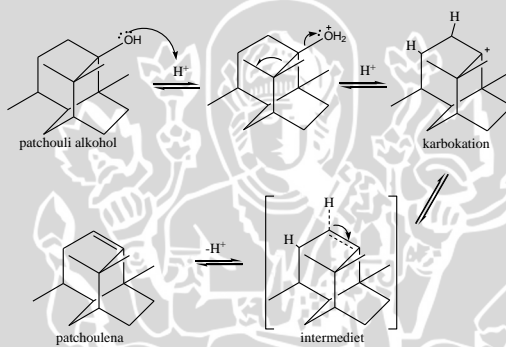


Gambar 4.15: Pola fragmentasi yang disarankan untuk α -patchoulena

Kromatogram pada Gambar 4.10 menunjukkan bahwa terdapat penyusun selain patchouli benzamida dalam campuran hasil sintesis, yaitu senyawa pada waktu retensi 8,748 menit dengan kadar relatif sebesar 41,08%. Berdasarkan analisis dengan spektrometer massa, senyawa ini memiliki spektrum massa yang disajikan pada Gambar 4.15. Spektrum massa ini memiliki puncak dengan $m/z=204$, 189, 175, 161, 147, 133, 119, 105, 91, 77, 69, 55, 41 dan 30. Senyawa tersebut memiliki kemiripan dengan fragmentasi senyawa α -patchoulena (Lampiran I). Menurut Silverstein [8] pengurangan puncak 14 satuan yang secara teratur menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah hidrokarbon tak jenuh (terpenoid). Puncak $m/z=204$ merupakan ion molekul dari α -patchoulena. Puncak dari ion molekul

ini melepas $-\text{CH}_3$ sehingga terbentuk $m/z=189$. Puncak $m/z=189$ ini mengalami pelepasan $-\text{CH}_2$ secara berturut-turut sehingga didapatkan puncak $m/z=77$. Puncak dengan $m/z=41$ terjadi karena ion molekul terbelah secara homolitik. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa ini disajikan pada Gambar 4.15.

Kemungkinan penyebab α -patchoulena menjadi penyusun utama dalam campuran hasil sintesis adalah karena patchouli alkohol mengalami reaksi eliminasi atau dehidrasi saat penambahan katalis H_2SO_4 . Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa alkohol tersier mudah mengalami dehidrasi akibat adanya asam kuat apa saja menghasilkan suatu alkena dan reaksi eliminasi merupakan suatu reaksi samping yang lebih kuat pada reaksi substitusi [34].



Gambar 4.16: Mekanisme dehidrasi patchouli alkohol

Mekanisme pembentukan α -patchoulena dari patchouli alkohol (Gambar 4.16) didahului dengan adanya protonasi gugus $-\text{OH}$ dengan adanya asam sehingga terjadi pelepasan H_2O membentuk karbokation. Pembentukan karbokation ini akan mencari bentuk yang paling stabil. Setelah terbentuk karbokation, maka akan terjadi pelepasan H^+ membentuk alkena. Terbentuknya karbokation ini juga diharapkan pada reaksi *Ritter*, maka dari itu reaksi dehidrasi ini merupakan reaksi bersaing dengan reaksi substitusi pada reaksi *Ritter*.

4.3 Uji Toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test*

Toksisitas adalah daya bunuh senyawa terhadap organisme hewan. Pada farmakologi, hampir seluruh senyawa bioaktif selalu toksik pada dosis tinggi [14]. Maka dari itu, efek farmakologis dapat diketahui dengan uji toksisitas. Salah satu uji toksisitas dapat dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Keuntungan dari metode ini adalah cepat, murah, mudah dikerjakan, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya [15]. Metode ini umumnya digunakan untuk skrining awal potensi aktivitas biologis dari suatu ekstrak.

A. salina Leach merupakan organisme hewan yang sesuai untuk keperluan uji toksisitas. Pemilihan larva *A. salina* Leach menjadi hewan uji diantaranya mampu mengatasi perubahan tekanan osmotik dan regulasi ionik yang tinggi, memiliki membran kulit yang tipis sehingga efek sitotoksik dari senyawa bioaktif dapat dianalogkan dengan kematian sebuah sel dalam organisme dan memiliki toleransi pada selang salinitas yang luas [17]. Larva udang juga memiliki kemiripan dengan sistem mamalia seperti yang dilaporkan oleh Birndorf, dkk pada tahun 1975 bahwa RNA polimerase *A. salina* sama dengan jenis mamalia [35]. Selain itu, telur *A. salina* Leach memiliki daya tahan yang lama (dapat tetap hidup pada kondisi kering selama beberapa tahun) dan mudah menetas dalam waktu 48 jam sehingga pengerjaan relatif cepat [32]. Pelaksanaan uji toksisitas dilakukan dengan 3 kali pengulangan tiap konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan adalah 10, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm serta 0 ppm sebagai kontrol. Pembuatan larutan uji ditambahkan dengan DMSO sebanyak 1% dari total larutan sebagai pengemulsi agar senyawa yang diujikan (minyak nilam hasil distilasi dan cairan hasil sintesis) dapat larut dalam air laut.

Persen kematian dari *A. salina* setelah 24 jam perlakuan dengan larutan uji dihitung dengan menghitung larva *A. salina* yang hidup. Larva *A. salina* yang hidup ditandai dengan adanya pergerakan. Selanjutnya dapat ditentukan nilai LC_{50} . Adapun hasil perhitungan (Lampiran G.1) nilai LC_{50} dari minyak nilam hasil distilasi dan hasil sintesis (Lampiran G.2) disajikan pada Tabel 4.6. Menurut kriteria toksisitas berdasarkan Deciga-campos, dkk [29],

minyak nilam dan senyawa hasil sintesis termasuk dalam kriteria toksik karena memiliki LC₅₀ kurang dari 500 ppm.

Tabel 4.6: Hasil perhitungan LC₅₀ dari BSLT

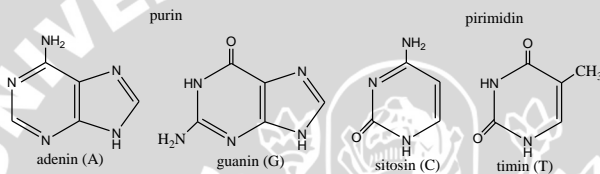
No.	Sampel	Persamaan grafik	LC ₅₀
1.	Minyak nilam residu distilasi	$y = 0,6462x$ $R^2 = 0,9809$	77,38 ppm
2.	Campuran Hasil Sintesis	$y = 0,6638x$ $R^2 = 0,9319$	72,18 ppm

Berdasarkan hasil uji toksisitas terhadap *A. salina*, minyak nilam dengan kadar patchouli alkohol 65,25 % memiliki LC₅₀ sebesar 77,38 ppm dan merupakan kriteria toksik kuat. Toksik kuat ini diindikasikan dengan tingkat kematian *A. salina* yang tinggi pada konsentrasi rendah. Kematian *A. salina* diduga akibat patchouli alkohol yang mampu menjadi inhibitor sintesis protein dari *A. salina* seperti yang pernah dilaporkan bahwa patchouli alkohol diduga mampu menjadi inhibitor sintesis protein neuraminidase pada virus influenza A (H2N2). Minyak nilam juga telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antivirus, antijamur [3], antibakteri [4] dan antiinflamasi [5].

Protein merupakan molekul yang ikut serta dalam menentukan struktur sel dan berfungsi sebagai enzim yang menentukan reaksi yang berlangsung di dalam sel [36]. Hal ini menunjukkan bahwa terhambatnya sintesis protein dapat mempengaruhi mekanisme dalam tubuh. Sintesis protein ditentukan oleh pesan genetik yang dikode dalam *deoxyribonucleic acid* (DNA). DNA adalah suatu polinukleotida dimana nukleotida tersusun atas gula deoksiribosa, basa nitrogen dan gugus fosfat. DNA disintesis pada proses replikasi. DNA akan mensintesis *ribonucleic acid* (RNA) pada proses transkripsi. RNA akan melalui proses yang disebut translasi, proses yang akan menghasilkan protein.

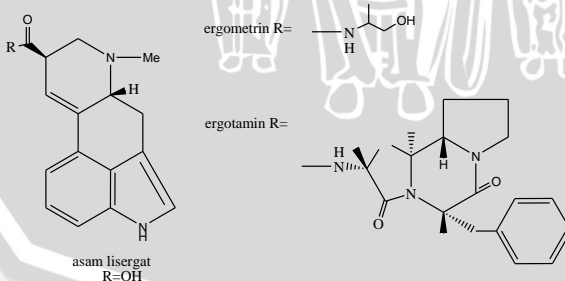
Kemampuan patchouli alkohol untuk menghambat sintesis protein dikarenakan gugus fungsinya. Patchouli alkohol memiliki gugus hidroksil (-OH), atom O ini bersifat elektronegatif sehingga mampu berikatan hidrogen dengan basa pada DNA. Macam-macam

basa penyusun DNA adalah adenin, guanin, sitosin dan timin yang dapat dilihat pada Gambar 4.17 [36]. Ikatan hidrogen adalah ikatan antara atom hidrogen (H) yang parsial positif dari satu molekul dengan pasangan elektron menyendiri dari atom yang elektronegatif (N,O, dan F) [34]. Ikatan hidrogen antara patchouli alkohol dengan basa nitrogen dalam DNA dapat menyebabkan kerusakan DNA. Modifikasi struktur dari patchouli alkohol menjadi patchouli benzamida diharapkan dapat menambah *binding site* dalam berikatan hydrogen dengan DNA. Patchouli benzamida memiliki atom N dan O yang keduanya dapat mengalami ikatan hidrogen.



Gambar 4.17: Struktur basa nitrogen

Nilai LC_{50} antara minyak nilam hasil distilasi dan senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa tidak ada peningkatan yang besar terhadap aktivitas dari minyak nilam. Kemungkinan hal ini disebabkan karena yield sintesis yang sangat sedikit, yaitu 5,48 % sehingga senyawa hasil sintesis tidak mempengaruhi toksisitas. Senyawa organonitrogen aromatik lain yang merupakan hasil sintesis dari bahan alam (asam lisergat) dapat dijumpai pada ergometrin dan ergotamine yang strukturnya dapat dilihat pada Gambar 4.18. Menurut Mann (1987), kedua senyawa ini merupakan alkaloid yang berupa amida dan digunakan sebagai obat untuk mengkontraksi dinding uterus [14].



Gambar 4.18: Struktur asam lisergat dan turunannya

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Reaksi antara patchouli alkohol dengan benzonitril menghasilkan patchouli benzamida dengan yield sebesar 5,48 %.
2. Berdasarkan uji toksisitas dengan BSLT, patchouli benzamida memiliki nilai LC_{50} sebesar 72,18 ppm yang termasuk dalam kriteria toksik dan berpotensi sebagai bahan obat.

5.2 Saran

1. Sebaiknya perangkaian alat distilasi dilakukan dengan teliti agar proses pengurangan tekanan dapat berjalan dengan baik sehingga didapatkan kadar patchouli alkohol yang lebih tinggi.
2. Perlu dilakukan lagi penelitian yang serupa dengan lama reaksi yang berbeda dan dengan pemanasan agar didapatkan yield yang lebih besar.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh jenis katalis asam terhadap reaksi *Ritter*.
3. Sebaiknya dilakukan pemurnian terhadap senyawa hasil sintesis agar diketahui toksisitas dari senyawa hasil sintesis yang murni.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Krismawati, A., 2005, **Nilam dan Potensi Pengembangannya Kalteng Jadikan Komoditas Rintisan** , *Tabloid Sinar Tani*, Jakarta.
- [2] Ambarsari, I., Choliq, A., dan Elisabeth, D.A., 2009, **Keragaman Usaha Pengolahan Minyak Nilam di Tingkat Petani Kabupaten Batang Jawa Tengah**, *Seminar Nasional Inovasi untuk Petani dan Peningkatan Daya Saing Produk Pertanian*, Batang.
- [3] Rong, T. dan Ting, Z., 2007, **Natural Antimicrobials from Plant Essential Oils**, *New Biocides Development*, 18, 364-387.
- [4] Kuntal, D, Gupta, N.K., Vijayabhaskar, S. dan Manjunath, 2011, **Antimicrobial Potential of Patchouli Oil Cultivated Under Acidic Soil Zone Of South India**, *Indian Journal of Novel Drug delivery* , 3(2), 104-111.
- [5] Tsai, Y., Hsu, H., Yang, W., Tsai, W., Chen, C., dan Watanabe, T., 2006, **a-Bulnesene, a PAF inhibitor isolated from the essential oil of *Pogostemon cablin***, http://xa.yimg.com/kq/groups/18654014/818480715/name/alfa_Bulnesene_patcpatch.pdf, diakses tanggal 10 Agustus 2011.
- [6] Wu, H., Li, B., Wang, X., Jin, M., dan Wang, G., 2011, **Inhibitory Effect and Possible Mechanism of Action of Patchouli Alcohol Against Influenza A (H2N2) Virus**, *Molecules*, 16, 6489-6501.

- [7] Hapsari, K.W., 2008, **Reaksi Esterifikasi Patchouli Alkohol dalam Minyak Nilam (*Patchouli Oil*) dengan Asam Asetat Anhidrid Menggunakan Katalis H_2SO_4 dan H_3PO_4** , *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [8] Novitasari, R.K., 2008, **Dehidrasi Patchouli Alkohol dalam Minyak Nilam (*Patchouli Oil*) Menggunakan Asam Sulfat (H_2SO_4) dan Asam Fosfat (H_3PO_4) dengan Variasi Pelarut**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
- [9] Aisyah, Y., Hastuti, P., Sastrohamidjojo, H., dan Hidayat, C., 2008, **Komposisi Kimia dan Sifat Antibakteri Minyak Nilam (*Pogestemon cablin*)**, *Majalah Farmasi Indonesia*, **19** (3), 151-156.
- [10] Abimanyu, H., Sulaswaty, A., Wuryaningsih dan Agustian, E., 2003, **Teknologi Distilasi Terfraksi dalam Pemurnian Komponen Minyak Atsiri**, Pusat Penelitian Informatika, Bandung.
- [11] Bulan, R., 2004, **Esterifikasi Patchouli Alkohol Hasil Isolasi dari Minyak Daun Nilam (*Patchouli Oil*)**, *Skripsi*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sumatera Utara, Medan.
- [12] Rahman, M. F. dan Masruri, 2004, **Isomerisasi α -pinena dalam Suasana Asam : Sintesis Senyawa Kairomon *Adalia bipunctata***, *Laporan Penelitian*, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang.

- [13] Corey, J.E., 2005, **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**, British Library Cataloguing in Publication Data, USA.
- [14] McLaughlin, J.L., L.L. Rogers and J.E. Anderson, 1998, **The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals**, *Drug Inform J.*, 32, 513-524
- [15] Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.B. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, dan J.L. McLaughlin, 1982, **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents**, *Planta Med.*, 45, 31-34.
- [16] Badan Standardisasi Nasional, 2006, **Persyaratan Mutu Minyak Nilam SNI 06-2385**, Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- [17] Hayani, E., 2005, **Teknik Analisis Mutu Minyak Nilam**, *Buletin Teknik Pertanian*, 10(1), 20-22.
- [18] Basri, I.H. dan Asman, A., 2005, **Pengaruh Penyiapan Bahan dan Penyulingan Terhadap Rendemen dan Kualitas Minyak Nilam**, *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Inovatif Pascapanenan untuk Pengembangan Industri Berbasis Pertanian*, Bogor.
- [19] Chemblink, 2011, **Patchouli Alcohol**, <http://www.chemblink.com/products/5986-550.htm>, diakses tanggal 10 Agustus 2011.
- [20] Ma'mun dan Maryadi, A., 2008, **Isolasi Patchouli Alkohol dari Minyak Nilam Untuk Bahan Referensi Pengujian dalam Analisis Mutu**, *Bul. Littro*, 19(1), 95 – 99.

- [21] Licker, M.D., 2003, **Dictionary of Chemistry Second Edition**, Mc Graw Hill, Inc. Company, New York.
- [22] Field, L.D, Sternhell, S., dan Kalman, J.R., 2008, **Organic Structure from Spectra Fourth Edition**, John Wiley dan Sons Ltd, USA.
- [23] Khopkar, S.M, 2008, **Konsep Dasar Kimia Analitik**, diterjemahkan oleh Saptorahardjo, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- [24] Coates, J., 2000, **Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach**, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- [25] Agusta, A., 2000, **Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia**, Penerbit ITB, Bandung.
- [26] Sastrohamidjojo, H., 1985, **Kromatografi**, Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- [27] Kurniawan, A., 2011, **Aktivitas Antioksidan dan Potensi Hayati dari Kombinasi Ekstrak Empat Jenis Tanaman Obat Indonesia**, *skripsi*, Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [28] Ali, S., Islam, S., Rahman, M., Islam, R., Sayeed, M.A., Islam, R., 2011, **Antibacterial and Cytotoxic Activity of Ethanol Extract of Mikania Cordata (Burm.F.) B.L. Robinson Leaves**, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, **2**, 103-107.

- [29] Bastos, M.L.A, Lima, M.R.F., Conserva, L.M., Andrade, V.S., Rocha, E.M.M., dan Lemos, R.P.L., 2009, **Studies on the Antimicrobial Activity and Brine Shrimp Toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) Extracts and Their Main Constituents**, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **16**(8), 1476-0711.
- [30] Widyastuti, S., 2008, **Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ipirih (*Ficus glabella* Blume) terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis**, *skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [31] Kartikasari, N. E., 2008, **Uji Toksisitas Ekstrak Daun Awar-awar (*Ficus septica* Burm.f) terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis**, *skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [32] Agilent, 2012, **GC Columns Stationary Phase Applications Guide**, <http://www.chem.agilent.com>, tanggal akses : 10 Januari 2012.
- [33] Clarke, T, Devine, J, dan Dicker, D.W., 1964, **Application of The Ritter Reaction to a-Olefins**, *Journal of The American Oil Chemist Society*, **41**, 78-82.
- [34] Fessenden, R,J dan Fessenden, J,S., 1982, **Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1**, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- [35] Elhardallou, S.B., 2011, **Cytotoxicity and Biological Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants**, *Res. J. Med. Plants*, **5** (3), 201-229.

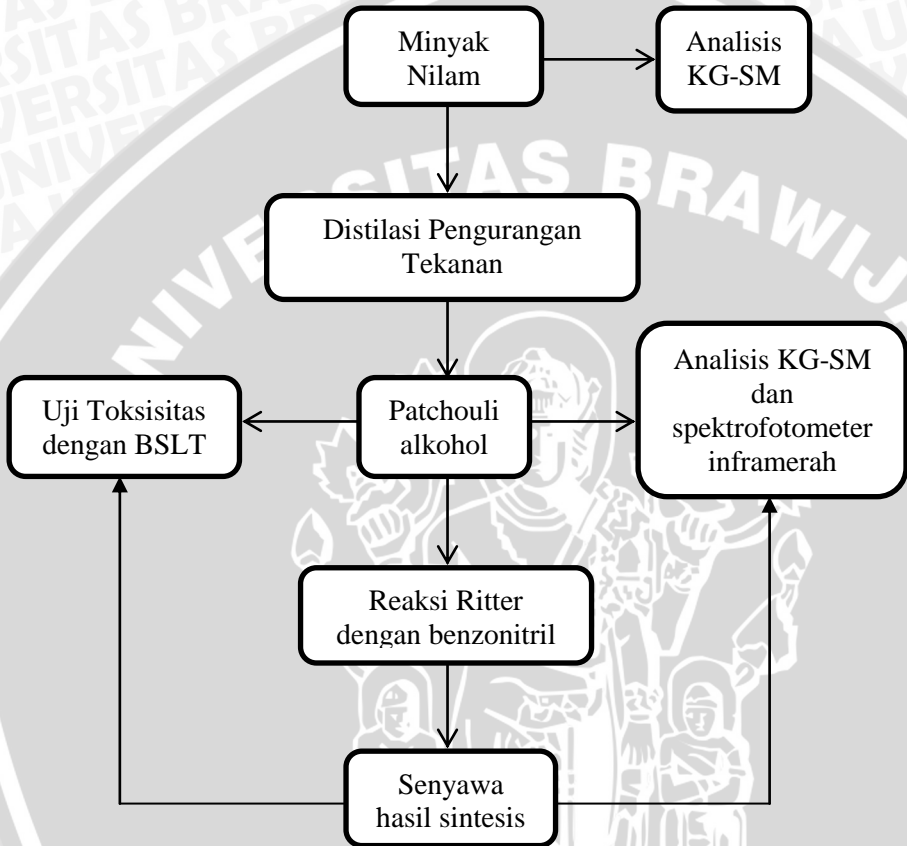
[36] Nelson, D. L. dan Cox, M. M., 2005, **Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition**, University of Wisconsin Press, USA.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



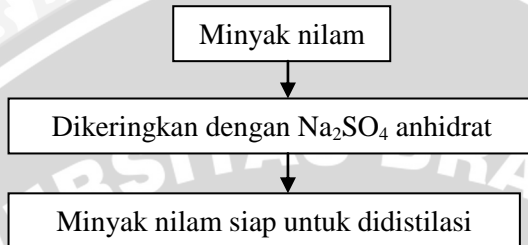
LAMPIRAN

A. Diagram Alir Penelitian

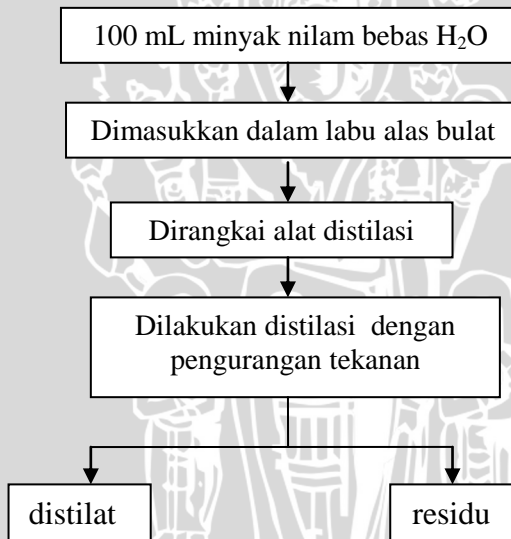


B. Skema Kerja Tahapan Penelitian

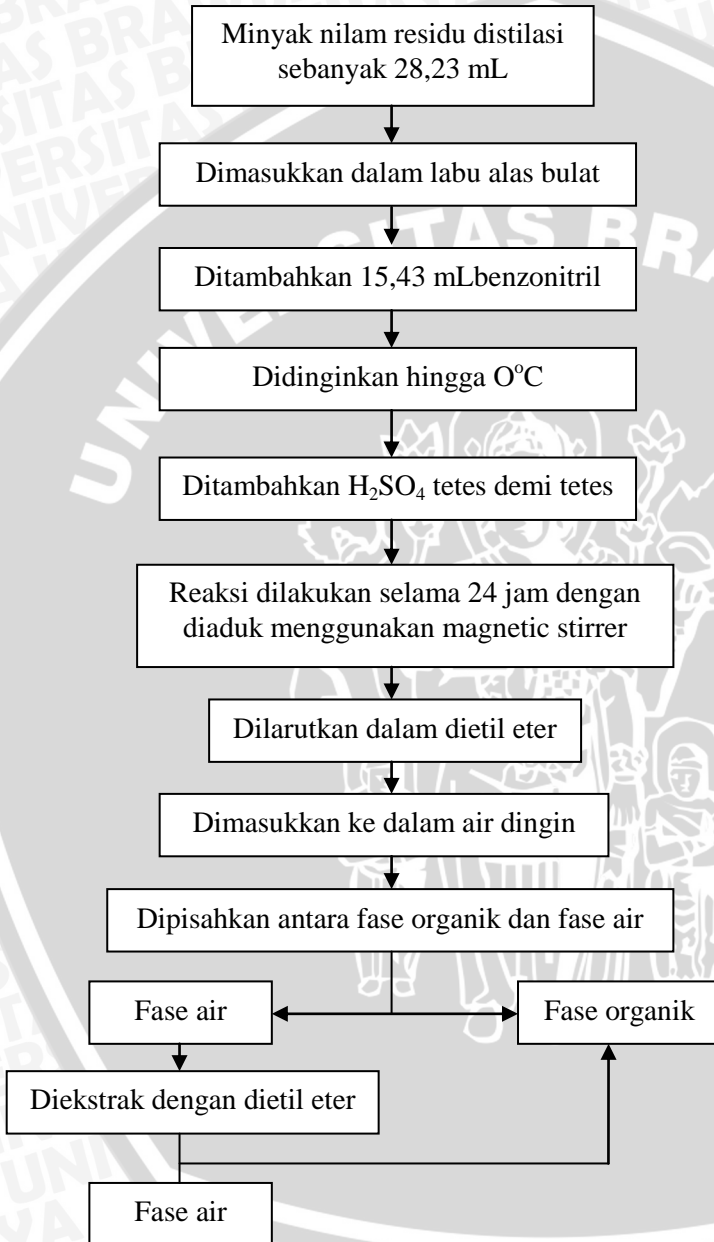
B.1 Preparasi Minyak Nilam

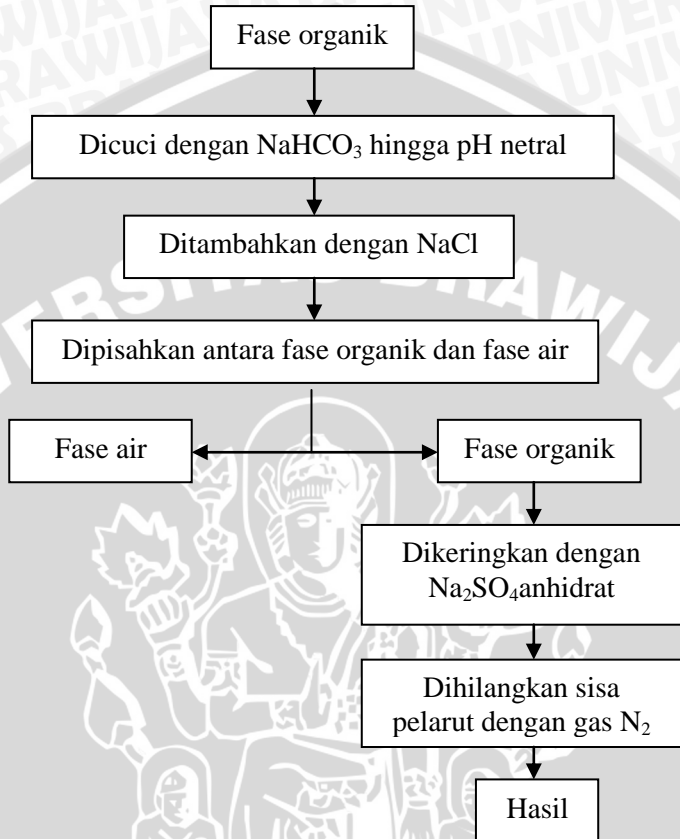


B.2 Distilasi Minyak Nilam



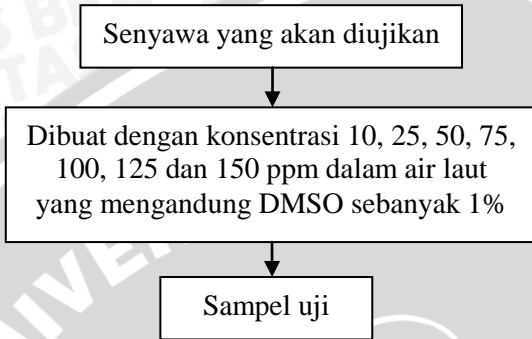
B.3 Reaksi Ritter



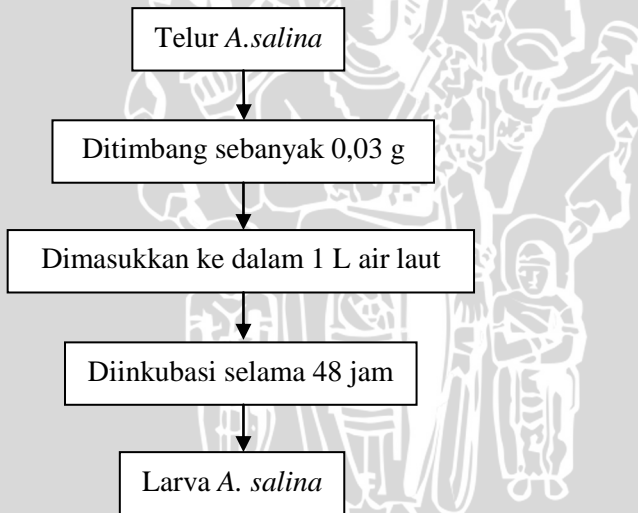


B.4 Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

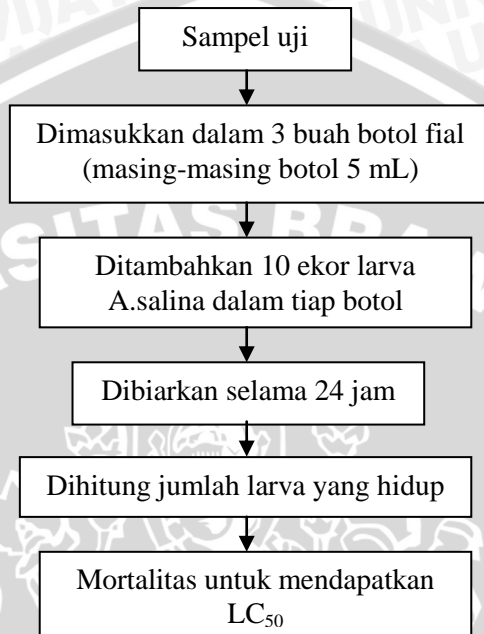
B.4.1 Penyiapan sampel



B.4.2 Penyiapan larva *Artemia salina*



B.4.3 Pelaksanaan Uji



C. Perhitungan Preparasi Bahan Sintesis

Perbandingan mol yang digunakan antara patchouli alkohol : benzonitril : asam sulfat adalah 1:1,5:4

C.1 Perhitungan Patchouli Alkohol

$$\begin{aligned} \text{Massa patchouli alkohol} &= \text{mol yang dibutuhkan} \times \text{BM} \\ &= 0,1 \text{ mol} \times 222 \text{ g/mol} \\ &= 22,2 \text{ g} \end{aligned}$$

Massa minyak nilam yang dibutuhkan

$$= \frac{100\%}{65,25\%} \times \text{massa patchouli alkohol}$$

↘
Jumlah kadar relatif berdasarkan kromatogram

$$= \frac{100\%}{65,25\%} \times 22,2 \text{ g}$$

$$= 34,023 \text{ g}$$

Volume minyak nilam yang dibutuhkan

$$= \frac{\text{massa}}{\rho_{\text{minyak hasil pengukuran}}}$$

$$= \frac{34,023 \text{ g}}{1,205 \text{ g/mL}}$$

$$= 28,23 \text{ mL}$$

C.2 Perhitungan Benzonitril

Massa benzonitril = mol yang dibutuhkan x BM

$$= 0,15 \text{ mol} \times 103,1 \text{ g/mol}$$

$$= 15,465 \text{ g}$$

Volume benzonitril = $\frac{\text{massa}}{\rho_{\text{benzonitril}}}$

$$= \frac{15,465 \text{ g}}{1,01 \text{ g/mL}}$$

$$= 15,43 \text{ mL}$$

C.3 Perhitungan Asam Sulfat

Massa asam sulfat = mol asam sulfat x BM

$$= 0,4 \text{ mol} \times 98,08 \text{ g/mol}$$

$$= 39,232 \text{ g}$$

Konsentrasi asam sulfat yang tersedia adalah 97%, sehingga massa asam sulfat yang dibutuhkan

$$= \frac{100\%}{97\%} \times 39,232 \text{ g}$$

$$= 40,45 \text{ g}$$

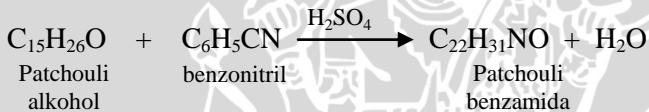
$$\begin{aligned} \text{Volume asam sulfat} &= \frac{\text{massa}}{\rho} \\ &= \frac{40,45 \text{ g}}{1,84 \text{ g/mL}} \\ &= 21,98 \text{ mL} \approx 22 \text{ mL} \end{aligned}$$

D. Perhitungan Yield Sintesis

$$\text{Massa cairan hasil sintesis} = 19,31 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa patchouli benzamida} &= \frac{9,21 \%}{100 \%} \times 139,01 \text{ g} \\ &= 1,78 \text{ g} \end{aligned}$$

Persamaan reaksi:



$$\begin{aligned} \text{Mol patchouli benzamida} &= \text{mol patchouli alkohol} \\ &= 0,1 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa patchouli benzamida teoritis} &= 0,1 \text{ mol} \times 325 \text{ g/mol} \\ &= 32,5 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield} &= \frac{\text{Massa patchouli benzamida penelitian}}{\text{Massa patchouli benzamida teoritis}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,78 \text{ g}}{32,5 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 5,48 \% \end{aligned}$$

E. Perhitungan Larutan Kontrol untuk Uji Toksisitas

$$\text{Larutan DMSO 1\%} = \frac{x}{250 \text{ ml}} \times 100\%$$
$$x = 2,5 \text{ ml}$$

Jadi, untuk membuat larutan kontrol dibutuhkan larutan DMSO pekat sebanyak 2,5 ml yang diencerkan dengan air laut.

F. Perhitungan pada Persiapan Larutan Uji untuk Uji Toksisitas

F.1 Pembuatan Larutan Uji 500 ppm (v/v)

$$500 \text{ ppm} = \frac{500 \text{ mg}}{1 \text{ L}}$$

$$0,5 \text{ g/mL} = \frac{x}{250 \text{ mL}}$$

$$x = 0,5 \text{ g/mL} \times 250 \text{ mL}$$
$$= 0,125 \text{ g}$$

Jadi, ditimbang larutan uji pekat sebanyak 0,125 g dan diencerkan dengan air laut yang mengandung DMSO 1% untuk membuat larutan dengan konsentrasi 250 dalam labu takar 250 ml.

F.2 Pembuatan Larutan Uji 125 ppm (v/v)

$$M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} = M_{125 \text{ ppm}} \times V_{125 \text{ ppm}}$$
$$500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} = 125 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$
$$V_{500 \text{ ppm}} = 12,5 \text{ ml}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 12,5 ml untuk membuat larutan uji 125 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

F.3 Pembuatan Larutan Uji 100 ppm (v/v)

$$M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} = M_{100 \text{ ppm}} \times V_{100 \text{ ppm}}$$
$$500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} = 100 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml}$$
$$V_{500 \text{ ppm}} = 10 \text{ ml}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 10 ml untuk membuat larutan uji 100 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

F.4 Pembuatan Larutan Uji 75 ppm (v/v)

$$\begin{aligned}M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} &= M_{75 \text{ ppm}} \times V_{75 \text{ ppm}} \\500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} &= 75 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml} \\V_{500 \text{ ppm}} &= 7,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 7,5 ml untuk membuat larutan uji 75 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

F.5 Pembuatan Larutan Uji 50 ppm (v/v)

$$\begin{aligned}M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} &= M_{50 \text{ ppm}} \times V_{50 \text{ ppm}} \\500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} &= 50 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml} \\V_{500 \text{ ppm}} &= 5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 5 ml untuk membuat larutan uji 50 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

F.6 Pembuatan Larutan Uji 25 ppm (v/v)

$$\begin{aligned}M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} &= M_{25 \text{ ppm}} \times V_{25 \text{ ppm}} \\500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} &= 25 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml} \\V_{500 \text{ ppm}} &= 2,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 2,5 ml untuk membuat larutan uji 25 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

F.7 Pembuatan Larutan Uji 10 ppm (v/v)

$$\begin{aligned}M_{500 \text{ ppm}} \times V_{500 \text{ ppm}} &= M_{10 \text{ ppm}} \times V_{10 \text{ ppm}} \\500 \text{ ppm} \times V_{500 \text{ ppm}} &= 10 \text{ ppm} \times 50 \text{ ml} \\V_{500 \text{ ppm}} &= 1 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi, dibutuhkan larutan uji 500 ppm sebanyak 1 ml untuk membuat larutan uji 10 ppm di dalam labu ukur 50 ml.

G. Perhitungan Hasil Uji Toksisitas

G.1 Perhitungan LC₅₀ Patchouli Alkohol

Tabel L.1 Data Hasil Pengamatan Uji Toksisitas Patchouli Alkohol

konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Hidup			Mortalitas (%)			Mortalitas rata-rata (%)
	I	II	III	I	II	III	
0	10	10	10	0	0	0	0
10	10	9	9	0	10	10	6.67
25	8	8	9	20	20	10	16.67
50	7	7	6	30	30	40	33.33
75	5	6	5	50	40	50	46.67
100	5	5	4	50	50	60	53.33
125	1	1	2	90	90	80	86.67
150	0	0	0	100	100	100	100.00

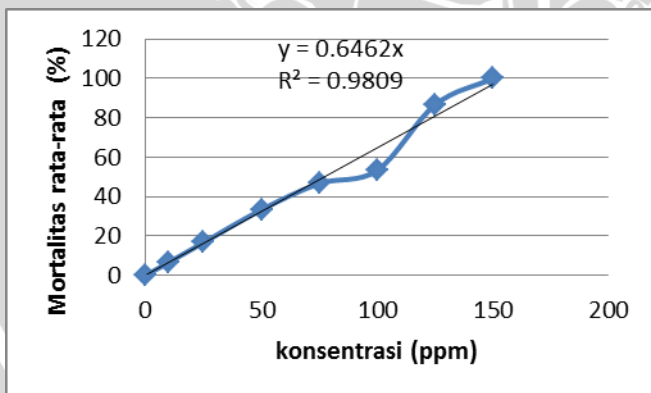
$$y = 0,6462x$$

$$y = 50$$

$$50 = 0,6462 x$$

$$x = \frac{50}{0.6462}$$

$$= 77,38 \text{ ppm}$$

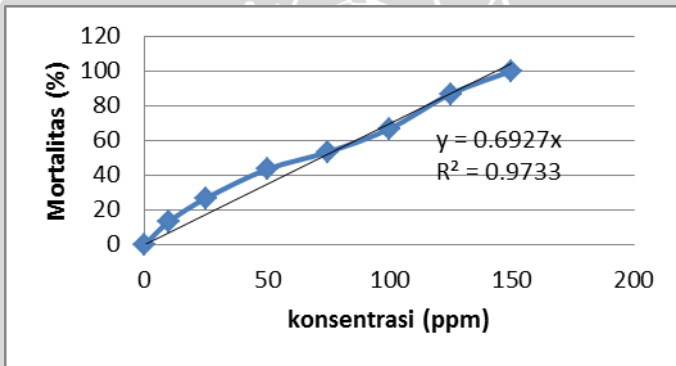


Gambar G.1: Grafik Penentuan LC₅₀ Patchouli Alkohol

G.2 Perhitungan LC₅₀ Senyawa Hasil Sintesis

Tabel L.2 Data Hasil Pengamatan Uji Toksisitas Senyawa Hasil Sintesis

konsentrasi (ppm)	larva hidup			mortalitas			mortalitas rata-rata (%)
	I	II	III	I	II	III	
0	10	10	10	0	0.00	0	0
10	9	8	9	10	20	10	13.33
25	7	7	8	30	30	20	26.67
50	5	5	7	50	50	30	43.33
75	5	4	5	50	60	50	53.33
100	4	3	3	60	70	70	66.67
125	1	2	1	90	80	90	86.67
150	0	0	0	100	100	100	100



Gambar G.2: Grafik Penentuan LC₅₀ Senyawa Hasil Sintesis

$$y = 0,6927x$$

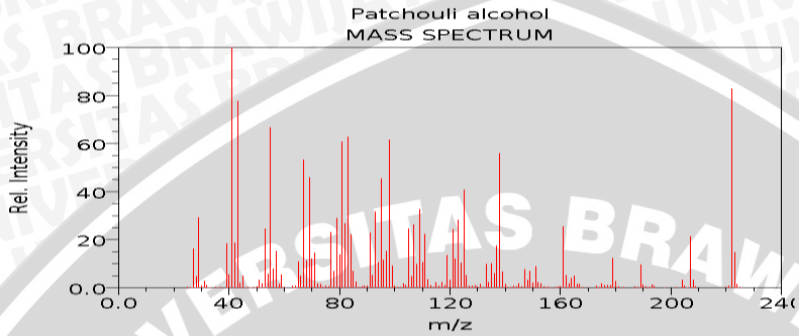
$$y = 50$$

$$50 = 0,6927x$$

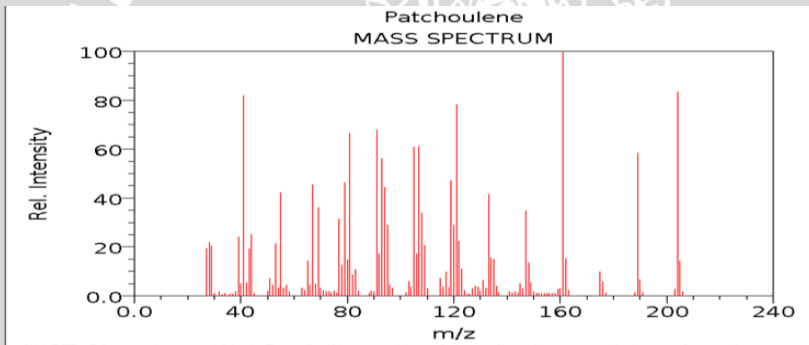
$$x = \frac{50}{0,6927}$$

$$= 72,18 \text{ ppm}$$

H. Spektrum Massa Patchouli Alkohol Standar



I. Spektrum Massa α -Patchoulena Standar



J. Gambar Penelitian

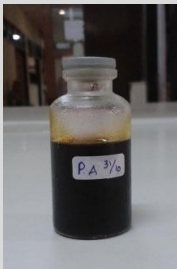
J.1 Minyak Nilam Perdagangan



J.2 Rangkaian Alat Distilasi dengan Pengurangan Tekanan



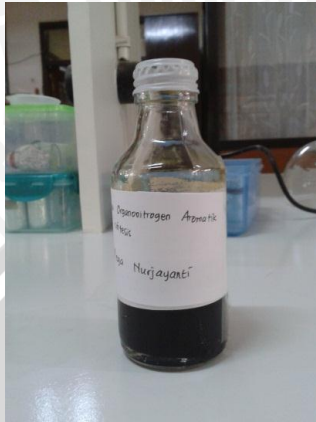
J.3 Residu Distilasi



J.4 Rangkaian Alat Reaksi Ritter



J.5 Campuran Hasil Sintesis



J.6 Uji Toksisitas dengan BSLT

