

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Pelaksanaan penelitian selama lima bulan dimulai dari bulan Februari 2017 hingga Juni 2017. Hasil sintesis dikarakterisasi dengan menggunakan FT-IR di Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia Universitas Brawijaya Malang dan Spektrometer Massa di Laboratorium Instrumen Polinema.

#### **3.2. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan antara lain seperangkat alat refluks, erlenmeyer, piknometer, gelas kimia, corong gelas, corong buchner, gelas ukur, pengaduk magnetik, pipet tetes, hotplate, neraca digital analitik, FT-IR, KC-SM, UV-Vis.

#### **3.3. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan antara lain minyak gandapura yang diperoleh dari minyak perdagangan di Yogyakarta, natrium hidroksida (NaOH), asam sulfat (HCl) 37% (pa), anhidrida asetat (pa), asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 97% (pa), alumunium klorida ( $AlCl_3$ ) (pa), etanol 96% (pa), metanol (pa), aquades, 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH).

#### **3.4. Tahapan Penelitian**

Tahapan penelitian yang dilakukan antaran lain:

1. Karakterisasi minyak gandapura meliputi penentuan sifat fisik (warna, wujud, aroma dan berat jenis) serta identifikasi menggunakan FT-IR dan KG-SM.

2. Reaksi hidrolisis metil salisilat dalam minyak gandapura
3. Karakterisasi produk hidrolisis meliputi penentuan sifat fisik berdasarkan wujud, warna, aroma, titik leleh dan identifikasi menggunakan FT-IR.
4. Reaksi esterifikasi produk hidrolisis.
5. Karakterisasi produk esterifikasi meliputi penentuan sifat fisik berdasarkan wujud, warna, aroma, titik leleh dan identifikasi menggunakan FT-IR.
6. Reaksi asetilasi produk esterifikasi dengan variasi mol asam 2-asetiloksisalisilat : anhidrida asetat 1:1 ; 1:2 ; 2:1
7. Karakterisasi produk asetilasi meliputi penentuan sifat fisik berdasarkan wujud, warna, aroma, titik leleh dan identifikasi menggunakan FT-IR dan Spektrometer Massa.
8. Uji aktivitas antioksidan terhadap asam 5-asetil-2-hidroksibenzoat dengan metode DPPH.

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Karakterisasi Minyak Gandapura**

##### **a. Karakterisasi Sifat Fisik Minyak Gandapura**

Karakterisasi sifat fisik minyak gandapura berdasarkan penentuan warna, wujud, aroma dan berat jenis. Warna serta wujud diidentifikasi secara visual serta aroma dikarakterisasi dengan uji organoleptis. Berat jenis minyak gandapura ditentukan dengan menimbang berat kosong piknometer 1 mL dan berat piknometer berisi aquades. Piknometer berisi minyak gandapura ditimbang dan penentuan berat jenis ditentukan berdasarkan perhitungan data yang diperoleh.

##### **b. Identifikasi Senyawa dalam Minyak Gandapura dengan FTIR**

Identifikasi senyawa dalam minyak gandapura menggunakan FT-IR 8400S tipe Michelson sistem optik sinar tunggal dengan metode lempengan NaCl. 1 tetes minyak gandapura diteteskan pada lempengan NaCl. Kemudian lempengan NaCl yang mengandung sampel minyak gandapura diletakkan pada sampel holder diantara

dua celah yang dilewati berkas sinar inframerah serta dibuat spektrum pada bilangan gelombang 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Sumber sinar inframerah keramik globular, S/N 20000:1 dan medium sampel lempengan NaCl

### **c. Identifikasi Senyawa dalam Minyak Gandapura dengan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (KG-SM)**

Identifikasi senyawa dalam minyak gandapura digunakan alat KG-SM yaitu tipe alat SHIMADZU QP210S dengan kondisi sebagai berikut:

Jenis kolom	: Restek Rtx-5MS
Panjang kolom	: 30 meter
Fasa diam	: 5 % difenil, 95 % dimetilpolisikloheksana
Temperatur kolom	: 70 °C (3 °C/menit)
Gas pembawa	: Gas Helium
Tekanan gas	: 28 kPa
Kecepatan aliran gas	: 3 mL/min
Split ratio	: 139,2
Jenis pengion	: EI ( <i>electron ionization</i> ) 70 eV
Temperatur injektor	: 310 °C.

Identifikasi dilakukan dengan cara 0,3  $\mu\text{L}$  sampel minyak gandapura diinjeksikan ke dalam alat KG-SM.

### **3.5.2. Reaksi Hidrolisis Metil Salisilat dalam Minyak Gandapura**

30 mL minyak gandapura dimasukkan ke dalam labu leher tiga dan ditambahkan 232 mL NaOH 2M dan direfluks selama 2 jam pada temperatur 110 °C kemudian didinginkan dan diasamkan dengan HCl pekat hingga pH 1 kemudian disaring. Endapan dilarutkan dalam air mendidih dan dilakukan penyaringan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian direkristalisasi dan kristal yang terbentuk disaring. Hasilnya dikeringkan dalam oven dan ditimbang hingga diperoleh massa konstan.

### **3.5.3. Karakterisasi Produk Hidrolisis**

#### **a. Karakterisasi Sifat Fisik Produk Hidrolisis**

Senyawa produk hidrolisis dilakukan karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan warna, wujud dan titik leleh. Karakterisasi warna dan wujud produk hidrolisis dilakukan secara visual.

Penentuan titik leleh dilakukan dengan cara memasukkan padatan ke dalam pipa kapiler dengan diameter 1 cm kemudian dimasukkan ke dalam *melting point apparatus digital*. Titik leleh *melting point apparatus* diatur dibawah titik leleh produk hidrolisis yaitu asam salisilat yang mempunyai titik leleh 159 °C.

#### **b. Identifikasi Senyawa dalam Produk Hidrolisis dengan FTIR**

Senyawa produk hidrolisis diidentifikasi dengan spektrofotometri FT-IR. Spesifikasi FT-IR yaitu tipe Michelson sistem optik sinar tunggal, sumber sinar inframerah keramik globular, S/N 20000:1 dan medium sampel pellet KBr. Pellet KBr dibuat dengan cara mencampur 0,002 g padatan hasil sintesis dan 0,075 g KBr kemudian digerus. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pellet press dan dikompresi. Pelet KBr diletakkan diantara dua celah yang dilewati berkas sinar inframerah dan dibuat spektrumnya pada rentang bilangan gelombang 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.5.4. Reaksi Esterifikasi Produk Hidrolisis**

10 g asam salisilat dimasukkan dalam labu alas bulat dan ditambahkan 15 g anhidrida asetat dan 5 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sambil digoyangkan. Campuran dipanaskan pada temperatur 60 °C selama 30 menit sambil diaduk. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 30 mL etanol panas dan 75 mL air panas. Campuran dipanaskan hingga larut dan dilakukan penyaringan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian direkrystalisasi dan kristal yang terbentuk disaring. Hasilnya dikeringkan dalam oven kemudian ditimbang hingga diperoleh massa konstan

### **3.5.5. Karakterisasi Produk Esterifikasi**

#### **a. Karakterisasi Sifat Fisik Produk Esterifikasi**

Senyawa produk esterifikasi dilakukan karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan warna, wujud dan titik leleh. Penentuan titik leleh hasil reaksi asetilasi dilakukan dengan cara memasukkan padatan ke dalam pipa kapiler dengan diameter 1 cm kemudian dimasukkan ke dalam *melting point apparatus* digital. Titik leleh *melting point apparatus* diatur dibawah titik leleh produk esterifikasi yaitu asam 2-asetiloksisalisilat yang mempunyai titik leleh 135 °C.

#### **b. Identifikasi Senyawa dalam Produk Esterifikasi dengan FTIR**

Senyawa produk esterifikasi diidentifikasi dengan spektrofotometri FT-IR. Spesifikasi FT-IR yaitu tipe Michelson sistem optik sinar tunggal, sumber sinar inframerah keramik globular, S/N 20000:1 dan medium sampel pellet KBr. Pellet KBr dibuat dengan cara mencampur 0,002 g padatan hasil sintesis dan 0,075 g KBr kemudian digerus. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pellet press dan dikompresi. Pelet KBr diletakkan diantara dua celah yang dilewati berkas sinar inframerah dan dibuat spektrumnya pada rentang bilangan gelombang 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **3.5.6. Reaksi Asetilasi Produk Esterifikasi dengan variasi mol asam 2-asetiloksisalisilat : anhidrida asetat 1:1; 1:2 dan 2:1**

Asam 2-asetiloksisalisilat ditambahkan 5 g  $\text{AlCl}_3$  dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat dengan pengaduk magnetik. campuran ditambahkan anhidrida asetat dengan variasi perbandingan mol asam 2-asetiloksisalisilat : anhidrida asetat yakni 1:1; 2:1 dan 1:2. Campuran dipanaskan pada temperatur 100 °C dengan penangas air selama 2 jam sambil diaduk. Hasilnya didinginkan dan ditambahkan 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Endapan yang diperoleh dikeringkan dan didinginkan pada desikator. Endapan kering dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan 25 mL NaOH dan direfluks selama 1

jam. Hasilnya didinginkan dan ditambahkan 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Endapan yang diperoleh disaring dan dikeringkan dalam oven.

### **3.5.7. Karakterisasi Produk Asetilasi**

#### **a. Karakterisasi Sifat Fisik Produk Asetilasi**

Senyawa produk asetilasi dilakukan karakterisasi sifat fisik berdasarkan penentuan warna, wujud dan titik leleh. Penentuan titik leleh hasil reaksi asetilasi dilakukan dengan cara memasukkan padatan ke dalam pipa kapiler dengan diameter 1 cm kemudian dimasukkan ke dalam *melting point apparatus* digital. Titik leleh *melting point apparatus* diatur dibawah titik leleh produk asetilasi yaitu asam 5-asetil-2-hidroksibenzoat yang mempunyai titik leleh 214 °C.

#### **b. Karakterisasi Senyawa dalam Produk Asetilasi dengan FTIR**

Senyawa produk asetilasi dikarakterisasi dengan spektrofotometri FT-IR. Spesifikasi FT-IR yaitu tipe Michelson sistem optik sinar tunggal, sumber sinar inframerah keramik globular, S/N 20000:1 dan medium sampel pellet KBr. Pellet KBr dibuat dengan cara mencampur 0,002 g padatan hasil sintesis dan 0,075 g KBr kemudian digerus. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pellet press dan dikompresi. Pelet KBr diletakkan diantara dua celah yang dilewati berkas sinar inframerah dan dibuat spektrumnya pada rentang bilangan gelombang 4000-600 cm<sup>-1</sup>.

#### **c. Identifikasi Senyawa dalam Produk Asetilasi dengan Spektrometer Massa**

Padatan hasil sintesis dilarutkan dalam methanol. Larutan diinjeksikan sebanyak  $\pm$  1 ppm ke dalam alat spektrometer massa dengan kondisi operasional sebagai berikut:

Tipe alat : LC-10 AD-QP 8000

Fasa gerak : Isokratik (0,1% asam format dan 70% asetonitril 0,1% asam format),

Tipe kolom : Hypersil Gold  
Volume injeksi : 10  $\mu$ L

### **3.5.8. Uji aktivitas antioksidan senyawa hasil sintesis dengan menggunakan metode DPPH**

Larutan induk senyawa hasil sintesis sebesar 1000 ppm dapat dibuat dengan melarutkan 50 mg sampel hasil sintesis pada 50 mL metanol. Selanjutnya dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol untuk memperoleh variasi konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dari larutan stok 1000 ppm pada masing-masing sampel. Larutan stok DPPH dapat dibuat dengan melarutkan 0,5 mg padatan DPPH dalam 10 mL metanol. Kemudian disiapkan larutan pembanding yaitu larutan kontrol yang berisi 2 mL metanol dan 1 mL larutan DPPH 50 ppm. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel berisi larutan sampel sebanyak 2 mL dan 1 mL larutan DPPH. Kemudian diinkubasi selama 30 menit. Sampel yang telah diinkubasi selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang DPPH yang digunakan. Pengukuran absorbansi dan panjang gelombang DPPH dilakukan dengan spektrofotometer UV Vis pada rentang panjang gelombang 800 hingga 400 nm. Pengujian antioksidan metode DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah di inkubasi bersama DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak maka akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari ungu tua hingga kuning terang.

Hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi (ppm) sebagai sumbu X dan % inhibisi sebagai sumbu Y. Nilai  $IC_{50}$  dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% dihitung dengan persamaan  $y = ax+b$ .

