

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT LUTEOLIN (SENYAWA 3',4'-
DIASETIL-5,7-DIHIDROKSIFLAVON)**

**ETHA AWALIYAH
N111 08 259**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT LUTEOLIN (SENYAWA 3',4'-
DIASETIL-5,7-DIHIDROKSIFLAVON)**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

UNIVERSITAS HASANUDDIN

**ETHA AWALIYAH
N111 08 259**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT LUTEOLIN (SENYAWA
3',4'-DIASETIL-5,7-DIHIDROKSIFLAVON)**

ETHA AWALIYAH

N111 08 259

UNIVERSITAS HASANUDDIN

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,

**Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt
NIP. 19751117 200012 2 002**

**Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
NIP.19771125 200212 2 003**

Pada tanggal, Juli 2013

PENGESAHAN

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT LUTEOLIN (SENYAWA
3',4'-DIASETIL-5,7-DIHIDROKSIFLAVON)**

Oleh :

**Etha Awaliyah
N111 08 259**

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal Juli 2013**

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua

Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. :

2. Sekretaris

Dr. Hj. Sartini, M.Si., Apt :

3. Ex Officio

Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. :

4. Ex Officio

Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt :

5. Anggota

Dra. Hj. Naimah Ramli, Apt. :

**Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin**

**Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Juli 2013

Penyusun,

Etha Awaliyah

UCAPAN TERIMA KASIH



Assalaamu'alaikum Warahmatullah Wabarakaatuh

Alhamdulillah Rabbil 'Alamiin, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas izin dan rahmat-Nya penulis mampu merampungkan penyusunan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar kesarjanaan pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penghormatan dan terima kasih setinggi-tingginya penulis hanturkan kepada kedua orang tua penulis Alm. bapak Muh. Tahang, S.Pd., yang selalu menjadi motivator yang sangat berarti bagi penulis hingga akhir hayatnya, Ibu Hj. Ruaena atas kasih sayang, doa dan dukungan, arahan, perhatian serta pengorbanan yang tiada henti-hentinya. Kepada saudara-saudara penulis Mushawiruddin Muhtar dan Asfihanuddin Muhtar yang selalu menjadi pendukung dan penyemangat bagi penulis serta kepada keluarga besar penulis atas dukungannya kepada penulis. Kepada Baso Ramdana, Amd penulis ucapkan terima kasih untuk semua bantuan, dukungan dan perhatiannya.

Banyak kendala dan hambatan yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini, namun berkat bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala dan hambatan tersebut.

Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt., dan Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt., selaku pembimbing utama dan pembimbing pertama yang telah memberikan arahan, nasihat, dan solusi-solusi dengan penuh kesabaran mulai dari perencanaan penelitian hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
2. Dekan Prof.Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt, Wakil Dekan I Prof. Dr. Gemini Alam. M.Si., Apt. Wakil Dekan II Prof. Dr.rer.nat. Hj. Marianti A. Manggau., Apt. Wakil Dekan III Bapak Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si., Apt., staf dosen, serta karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuan serta motivasi-motivasi yang diberikan.
3. Bapak Usmar, S.Si., M.Si., Apt selaku Penasihat Akademik penulis yang telah membimbing dan memberikan motivasi kepada penulis selama menjadi mahasiswa di Fakultas Farmasi Unhas.
4. Bapak Subehan, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt., Ibu Dr. Hj. Sartini, M.Si., Apt, dan Ibu Dra. Hj. Naimah Ramli, Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis hingga selesainya penulisan skripsi ini.
5. Teman-teman farmasi angkatan 2008 (STEROID '08) yang telah mengajarkan kebersamaan dan kekompakan serta keluh kesah yang telah dilalui bersama, canda tawa serta motivasi, dan dukungan baik

moril maupun materil yang tidak berujung sehingga hari-hari yang penulis lalui selalu penuh dengan semangat.

6. Laboran dan kru Laboratorium Biofarmaka Kanda Ismail, S.Si., Apt., dan Kanda M. Arifuddin S.Si., Apt., terima kasih untuk waktu dan bantuannya.
7. Kepada pihak yang tidak sempat disebut namanya, penulis mohon maaf dan terima kasih semoga Allah membalas semua kebaikan kalian selama ini.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini sangat jauh dari kesempurnaan, karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi terciptanya suatu karya yang lebih bermutu. Akhirnya, semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan kedepannya.

Makassar, Juli 2013

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan sintesis derivat luteolin menggunakan metode asetilasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa derivat luteolin, yang kemudian dikarakterisasi dengan metode spektrofotometri UV-Vis dan FT-IR. Sebanyak 5 mg luteolin murni direaksikan dengan asam asetat glasial dan piridin. Dari hasil asetilasi diperoleh senyawa sintetik derivat luteolin yang diduga merupakan senyawa 3',4'-diasetil-5,7-dihidroksiflavin sebanyak 3,9 mg. Senyawa sintetik tersebut kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan metode KLT dengan perbandingan eluen n-heksan : etil asetat : metanol (3:1:1). Hasil karakterisasi senyawa hasil sintesis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR menunjukkan karakteristik gugus yang mengandung gugus C-H (siklik), Dimer -COOH (aromatik), N-H (tersier), C=O (karbonil), C-O (terkonjugasi), C=C (aromatik) dan N-H serta menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 342,50 nm.

ABSTRACT

Synthesis of luteolin derivative, which was using acetylation method, has been done. The aim of this research was to obtaining luteolin derivative, which was than characterized by spectrophotometry UV-Vis and FT-IR. 5 mg of pure luteolin was reacted with glacial acetate acid and pyridine. As a result, 3.9 mg luteolin derivative which estimated as 3',4'-diacetyl-5,7-dihydroxyflavone was obtained. The purity of synthetic was then analyzed using TLC method with hexane : ethyl acetate : methanol (3:1:1) as eluen. Characterization results from spectrophotometer UV-Vis and FT-IR showed that the luteolin derivative coumpound consisted of C-H (cyclic), dimer -COOH (aromatic), N-H (tertiary), C=O (carbonyl), C-O (conjugated), C=C (aromatic) and N-H. The absorbtion of spectrophotometer was at wave length 342.50 nm.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Uraian Senyawa Luteolin	4
II.1.1 Sifat Kimia Luteolin.....	6
II.2 Desain Obat	7
II.3 Sintesis Kimia	8
II.4 Metode Analisis Kemurnian	8
II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	8
II.4.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	10
II.5 Metode Pemurnian	12
II.5.1 Kromatografi Cair Vakum	12

II.5.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	13
II.6 Elusidasi Struktur	14
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	18
III.1 Penyiapan Alat dan Bahan	18
III.2 Sintesis Senyawa	18
III.3 Analisis Kemurnian	19
III.3.1 Kromatografi Lapis Tipis	19
III.3.2 UFLC (Ultrafast Liquid Chromatography)	20
III.4 Karakterisasi Senyawa	21
III.4.1 Spektrofotometri UV-Vis	21
III.4.2 Spektrofotometri Infrared	21
III.5 Pemurnian Senyawa.....	22
III.5.1 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
IV.1 Hasil Penelitian	24
IV.1.1 Skema Reaksi Kimia	24
IV.1.2 Perbedaan Sifat Fisik antara <i>Parent Drug</i> dengan hasil sintesis.....	24
IV.1.3 Perbedaan Karakteristik antara <i>Parent Drug</i> dengan Hasil Sintesis	25
IV.2 Pembahasan	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	30
V.1 Kesimpulan	30

V.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Skema reaksi kimia pada proses sintesis	24
2. Perbandingan sifat fisik antara senyawa parent drug dan senyawa hasil sintesis	24
3. Data hasil karakterisasi senyawa Luteolin dan senyawa hasil sintesis.....	25
4. Data karakteristik FT-IR luteolin dan senyawa hasil sintesis	25
5. Data Spektra UFLC Senyawa Hasil Sintesis	37
6. Data Spektra UV-Vis Luteolin Murni	38
7. Data Spektra UV-Vis Senyawa Hasil Sintesis	39
8. Data Spektra FT-IR Senyawa Hasil Sintesis	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Dasar Flavonoid	4
2. Rumus Struktur Luteolin	6
3. Profil Kromatogram Hasil Sintesis Senyawa Derivat Luteolin (Senyawa 3',4'-Diasetil-5,7-Dihidroksiflavon). Fase diam silika gel dan fase gerak heksan-etil asetat (1:3), A : visualisasi dengan UV 254 nm, B : Visualisasi dengan UV 366 nm dan C : visualisasi dengan H ₂ SO ₄ . Rf SM = 0,72, Rf S1=0,57; Rf S2=0,87	36
4. Profil Kromatogram Hasil Separasi Senyawa Derivat Luteolin (Senyawa 3',4'-Diasetil-5,7-Dihidroksiflavon). Fase diam silika gel dan fase gerak heksan-etil asetat-metanol (3:1:1), A : visualisasi dengan UV 254 nm, B : Visualisasi dengan UV 366 nm. Rf A = 0,7 ; Rf B = 0,14.....	36
5. Spektra UFLC senyawa hasil sintesis.....	37
6. Spektra UV-Vis luteolin murni.....	38
7. Spektra UV-Vis senyawa hasil sintesis.....	39
8. Spektra FT-IR senyawa hasil sintesis.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Skema Kerja	35
2. Gambar dan Tabel Hasil Penelitian	36

BAB I

PENDAHULUAN

Luteolin, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon merupakan senyawa golongan flavonoid yang banyak terdapat dalam buah–buahan, sayur–sayuran serta berbagai jenis tanaman obat. Luteolin dimanfaatkan sebagai agen antiinflamasi, antioksidan, antikanker, serta antialergi (1).

Dari penelitian sebelumnya telah ditemukan bahwa senyawa luteolin memiliki efek antikanker dengan mekanisme yang sama dengan kuersetin yang dikarenakan adanya persamaan struktur antara kedua senyawa tersebut, mekanismenya yaitu dapat menghambat enzim DNA topoisomerase II pada *Leishmania* serta dapat berefek inhibitor topoisomerase I yang potensial pada DNA sel eukariotik (2), pada penelitian terbaru mengenai senyawa ini juga ditemukan bahwa kuersetin dan luteolin dapat berfungsi sebagai inhibitor jalur signal Hedgehog (Hh) (3,4). Selain itu pada penelitian lainnya dikemukakan bahwa luteolin juga dapat mempengaruhi jalur signal *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)* dengan cara mensupresi NF – κ B yang kemudian menginduksi terjadinya apoptosis oleh aktivasi TNF (1). Namun mekanisme antikanker yang lebih dititikberatkan yaitu inhibitor jalur signal Hedgehog karena dianggap lebih berpotensi dalam terapi pengobatan kanker.

Jalur signal Hedgehog (Hh) merupakan salah satu jalur signal yang berperan dalam mekanisme pertumbuhan sel embrio dan pemeliharaan jaringan otot dewasa. Protein Hh adalah polipeptida ligan yang ditemukan

pada *Drosophila* dan berperan penting dalam tahap akhir embryogenesis dan metamorphosis larva *Drosophila* (5). Protein ini berperan dalam proses transkripsi DNA. Gangguan pada komponen dasar jalur signal Hedgehog dapat menimbulkan cacat lahir bawaan pada embrio serta dapat memicu terjadinya kanker pada sel dewasa(3). Kelebihan GLI yang teraktivasi oleh jalur signal Hedgehog akan mengakibatkan terbentuknya tumor yang progresif, yang kemudian berkembang menjadi kanker seperti kanker pankreas dan kanker prostat. Jadi penting menjadikan jalur signal Hedgehog (Hh) sebagai target untuk penemuan obat anti kanker yang baru (4).

Senyawa luteolin murni dapat diperoleh dengan cara ekstraksi dan isolasi senyawa tersebut dari tanaman penghasilnya, seperti *Vitex negundo*, *Tomentosa salvia* dan berbagai jenis tanaman lainnya (2). Senyawa ini dapat bersifat inhibitor signal Hedgehog pada konsentrasi < 0,5 μM (IC_{50}) (6). Aktivitas ini perlu ditingkatkan menjadi skala nM untuk memperoleh efek terapi kanker yang lebih baik lagi, oleh karena itu perlu dilakukan sintesis senyawa derivat luteolin yang memiliki aktivitas antikanker yang lebih baik daripada senyawa bahan alamnya.

Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa derivat luteolin, luteolin merupakan senyawa induk (*Parent drug*) yang disintesis dengan metode asetilasi menggunakan asam asetat anhidrid sebagai pereaksi dan piridin sebagai katalistor (7), prosedur tersebut merupakan prosedur yang telah digunakan oleh peneliti sebelumnya yang kemudian

dimodifikasi untuk disesuaikan dengan sampel yang akan disintesis pada penelitian ini yaitu luteolin. Dari prosedur tersebut diharapkan dapat menghasilkan senyawa derivat luteolin yakni senyawa 3',4'-diasetil-5,7-dihidroksiflavan.

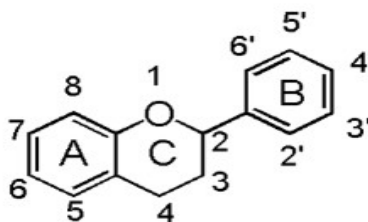
Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dimaksudkan untuk membuat senyawa sintetik derivat dari luteolin yang murni. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa sintetik derivat luteolin yang diperuntukkan sebagai bahan baku untuk selanjutnya dilakukan penelitian uji aktifitas antikanker secara *invivo* dari senyawa tersebut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Senyawa Luteolin (Senyawa induk)

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang banyak terdapat pada tanaman tinggi. Sampai saat ini telah berhasil diisolasi lebih dari 8000 jenis flavonoid dari berbagai jenis tanaman pada hampir seluruh bagian tanaman tersebut. Pada tanaman, flavonoid memiliki banyak fungsi diantaranya sebagai antioksidan, antimikrobal, fotoreseptor, atraktor visual dan skrining cahaya. Flavonoid memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen terikat pada rantai propan yang juga dapat membentuk cincin heterosiklik yang dihubungkan oleh jembatan hidrogen sehingga terbentuk senyawa 1,3-diarilpropan dengan susunan $C_6-C_3-C_6$. Klasifikasi flavonoid adalah : flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3-ol dan antosianidin (9).



Gambar 1 : Struktur dasar flavonoid

Flavon merupakan jenis senyawa flavonoid yang terbesar jumlahnya di alam dan juga lazim ditemukan. Dari penelitian sebelumnya ditemukan bahwa beberapa senyawa hidroksiflavon dan metoksiflavon

menunjukkan efek yang signifikan sebagai penghambat pertumbuhan terhadap jalur karsinogenesis jurkat, PC-3 dan kolon 205 (10).

Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) merupakan senyawa polifenol golongan flavon yang terdapat dalam jumlah yang berlimpah di dalam lada hijau, perilla, seledri, dan teh chamomile. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan efek kemopreventive kanker dari luteolin. Luteolin dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada banyak jenis sel kanker. Luteolin juga mampu menghambat berbagai jenis rangsangan yang diinduksi oleh ekspresi gen proinflamatori dan senyawa kimia penginduksi karsinogenesis payudara, kolon dan kulit (11).

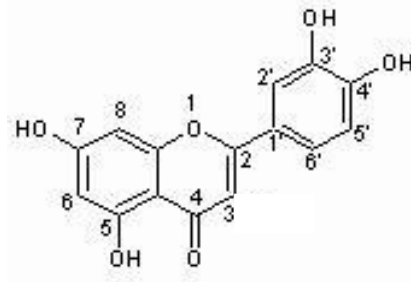
Luteolin dalam bentuk glikosida dapat menghambat aktivitas mediasi transcriptional Hh/GLI1 dengan IC_{50} pada konsentrasi 0,5 μ M, senyawa tersebut juga bersifat sitotoksik terhadap sel PANC1 (IC_{50} = 0,7 μ M) dan sel DU145 (IC_{50} = 0,8 μ M) (3), Hh/GLI1 signaling pathway merupakan jalur signal yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan embrio serta pada pemeliharaan jaringan dewasa.

Signal Hh pada proses transduksi diawali dengan pembentukan ikatan antara protein ligan Hedgehog yang disekresikan oleh epitelial sel tumor dengan reseptor PTCH pada membran. Ikatan ini menyebabkan terjadinya internalisasi reseptor PTCH ke dalam sel tumor sehingga efek inhibitor PTCH terhadap Smoothed (Smo) menghilang, Smo yang terbebas kemudian bergerak menuju daerah cilium, setelah terikat pada cilium Smo kemudian mengirim signal untuk mengaktifkan protein GLI

yang merupakan faktor transkripsi. Kelebihan konsentrasi GLI akan memicu pertumbuhan dan progresifitas sel tumor dan memicu terjadinya kanker seperti kanker pada pancreas dan prostat (4).

Luteolin juga dapat menginduksi terjadinya apoptosis melalui penghambatan enzim topoisomerase I dengan nilai $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$ (2) dan dapat menghambat jalur signal $\text{TNF-}\alpha$ pada konsentrasi $5 \mu\text{M}$ hingga $20 \mu\text{M}$ (12), serta menghambat enzim 15-lipoksigenase dengan nilai $IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ (15).

II.1.1 Sifat Kimia Luteolin



Gambar 2 :Rumus struktur luteolin

Nama IUPAC : 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4-chromenone

Sinonim : 3',4',5,7-tetrahidroksiflavan, 2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-4H-1-benzopiran-4-one, lutelol.

Rumus Molekul : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$.

Berat molekul : 286,2.

Titik lebur : 392°C .

Pemerian : Berupa serbuk kristal kuning, mudah teroksidasi oleh agen pengoksidasi, bersifat iritasi terhadap mata, system pernapasan, system gastrointestinal dan kulit.

Penyimpanan : Pada suhu 2 – 8°C, terlindung dari cahaya.

LD₅₀ : 180 mg/kg (pada tikus) (14).

Kelarutan : Larut dalam butanol, dimetil formamida, propanol, isopropanol, DMSO, aseton, etanol, heksan dan metanol (13).

II.2 Desain Obat

Dalam pengembangan dan penemuan obat baru, ada empat langkah utama, yaitu (1) dari bahan alam dengan melakukan skrining (penapisan) untuk mencari komponen bioaktif; (2) modifikasi struktur dari bahan obat yang sudah digunakan untuk meningkatkan aktivitas atau mencari aktivitas baru; (3) dari bahan kimia sintesa dan pemodelan hewan percobaan dengan melakukan penapisan skrining bahan-bahan kimia terhadap penyakit (menggunakan pemodelan hewan percobaan) dan (4) dari pendekatan modern desain obat dengan mendesain obat berbasis mekanisme fisiologi (19).

Desain obat merupakan proses iterasi dimulai dengan penentuan senyawa yang menunjukkan sifat biologi penting dan diakhiri dengan langkah optimasi, baik dari profil aktivitas maupun sintesis senyawa kimia. Tanpa pengetahuan lengkap tentang proses kimia yang bertanggung jawab terhadap aktivitas biologis, hipotesis desain obat umumnya didasarkan pada pengujian kemiripan struktural dan perbedaan antara molekul aktif dan tak aktif (20). Tujuan utama desain obat dalam ilmu kimia medisinal adalah dapat menemukan suatu molekul yang akan

menghasilkan efek biologis yang bermanfaat tanpa memberikan efek biologis yang merugikan (21).

II.3. Sintesis Kimia

Sintesis dalam bahasa Yunani artinya “meletakkan bersama–sama”. Sintesis kimia organik adalah seni pembentukan struktur molekul kompleks dari suatu senyawa prekursor yang lebih mudah diperoleh melalui serangkaian reaksi kimia rumit yang didesain dengan analisis retrosintesis berdasarkan serangkaian diskoneksi reaksi gugus fungsi (22).

Reaksi kimia dalam sintesis meliputi penggabungan gugus fungsi atau penggantian gugus fungsi. Reaksi–reaksi tersebut umumnya melalui intermediet (zat antara) ionik dan ikatan–ikatan C–X terpolarisasi atau ikatan–ikatan π (8).

II.4 Metode Analisis Kemurnian

II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan suatu metode analisis di mana fase gerak bergerak melewati fase diam sehingga campuran senyawa dapat terpisah menjadi komponen–komponen. Istilah “Kromatografi Lapis Tipis” pertama kali diperkenalkan oleh E. Stahl pada tahun 1956, yang berarti proses pemisahan secara kromatografi di mana fase diam terdiri dari lempeng tipis yang digunakan pada suatu substrat. KLT digunakan dibidang farmasi, kimia klinik, kimia forensik, biokimia, kosmetik, analisis makanan, analisis lingkungan, analisis senyawa anorganik dan elektrolitik (16).

Pelarut yang digunakan dalam KLT memiliki karakteristik permukaan dan sifat fisika-kimia. Selain itu, banyak pilihan fase gerak yang dapat digunakan untuk memisahkan campuran senyawa; umumnya memiliki sifat yang berbeda seperti donor proton, aseptor proton, dan dipol. Dalam KLT, absorpsi ultraviolet (UV) dari fase gerak tidak berperan penting dalam deteksi dan kuantifikasi karena fase gerak akan menguap sebelum dideteksi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang tidak memiliki viskositas yang tinggi (17).

Selain itu, manfaat KLT yaitu lempeng hanya dapat digunakan sekali, dengan demikian penyiapan sampel lebih simpel dari metode lain seperti Kromatografi Gas (KG) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Beberapa sampel dapat dianalisis pada waktu yang sama pada satu lempeng KLT atau KCKT, sehingga mengurangi waktu volume pelarut yang digunakan untuk tiap sampel. Pengerjaan beberapa sampel dalam lempeng yang sama memberikan manfaat yaitu akurasi dan presisi pada saat analisis kuantitatif menggunakan densitometri (17).

KLT memiliki beberapa parameter antara lain sebagai berikut:

a. *Retardation Factor* (R_f)

Posisi noda pada KLT dapat diuraikan dengan retardation factor (R_f), yang merupakan hasil bagi antara jarak pergerakan noda dari batas bawah dengan jarak antara batas bawah dengan batas atas.

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_f}$$

Di mana:

R_f = retardation factor

Z_s = jarak noda dengan batas bawah (mm)

Z_f = jarak batas atas dengan batas bawah (mm) (17).

b. Konstanta Alir

Konstanta alir (κ) merupakan pengukuran laju pergerakan pelarut (eluen). Parameter ini penting dalam KLT dan dapat digunakan untuk menghitung, misalnya waktu elusi dengan jarak pemisahan yang berbeda, sehingga membuktikan bahwa fase diam, sistem pelarut, tipe *chamber* dan suhu konstan. Konstanta alir dapat dirumuskan dengan:

$$\kappa = \frac{Z_f^2}{t}$$

Di mana:

κ = Konstanta alir (mm^2/s)

Z_f = jarak awal pergerakan pelarut dengan batas atas (mm)

t = waktu elusi (s) (17).

II.4.2 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* merupakan suatu metode analisis kromatografi yang memiliki sensitifitas tinggi dibanding metode kromatografi cair lainnya, bersifat tidak destruktif serta dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. KCKT dapat digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam

amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi (27). Salah satu jenis terbaru dari KCKT yaitu *Ultrafast Liquid Chromatography (UFLC)* merupakan metode analisis yang lebih sensitif dibanding jenis KCKT yang lain. UFLC dapat mendeteksi senyawa dengan lebih cepat dan dengan nilai presisi yang tinggi serta dapat digunakan untuk menganalisis senyawa yang tidak stabil pada tekanan yang tinggi karena UFLC dapat dioperasikan pada tekanan normal yang lebih rendah dibanding tekanan yang digunakan pada jenis KCKT lainnya.

Prinsip kerja KCKT sama seperti kromatografi cair lainnya yaitu pemisahan komponen sampel dengan cara melewati sampel tersebut pada suatu fase diam yang berupa kolom menggunakan fase gerak berupa pelarut yang sesuai dan memiliki kemurnian yang tinggi, kemudian selanjutnya dilakukan pengukuran kadar masing-masing komponen-komponen tersebut dengan suatu detektor. Kerja detektor bermacam-macam, tetapi pada dasarnya membandingkan respon dari komponen sampel dengan respon dari larutan standar (27). Prinsip pemisahan KCKT yaitu perbedaan distribusi komponen di antara fase gerak dan fase diam yang menyebabkan migrasi diferensial komponen-komponen analit dalam kolom kromatografi (28).

Data yang diperoleh dari instrument KCKT yaitu berupa nilai waktu retensi yang spesifik bagi setiap senyawa. Waktu retensi adalah selang

waktu yang diperlukan oleh sampel (solut) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor (29).

II.5 Metode Pemurnian

II.5.1 Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi cair vakum dapat diartikan sebagai suatu proses yang dilakukan pada suatu kolom pendek dengan pengisapan untuk mempercepat aliran pelarut. Fase diam (sorben) dipadatkan di dalam kolom pendek atau corong *Buchner*. Sorben dipadatkan dengan mengetuk pinggir kolom pada saat pengisian kemudian menekan lapisan atas sorben dengan benda yang memiliki permukaan yang rata sambil terus diisap dengan pompa vakum. Pemadatan diselesaikan dengan melepas alat vakum lalu menuangkan pelarut dengan kepolaran rendah melalui permukaan sorben lalu diisap dengan pompa vakum. Pemadatan kolom tepat bila aliran pelarut membentuk garis mendatar, jika tidak sorben harus dikeringkan, dipadatkan ulang, lalu diuji kembali. Ketika semua pelarut telah melewati kolom, sisa pelarut yang terperangkap di antara partikel sorben harus dikeluarkan melalui pengisapan. Sampel yang telah dilarutkan di dalam pelarut yang cocok atau yang telah dicampur dengan sejumlah kecil sorben atau bahan inert diletakkan di atas padatan sorben. Jika menggunakan larutan sampel, pelarut harus diisap ke dalam padatan kolom. Sepotong kertas saring dengan diameter yang sama dengan diameter kolom ditempatkan di atas sorben untuk menghindari kekacauan sorben pada saat penambahan pelarut. Kemudian kolom

dielusi dengan campuran pelarut dengan meningkatkan kepolaran pelarut secara berangsur-angsur. Sebelum pelarut selanjutnya dimasukkan, sorben harus diisap sampai kering dan eluen berisi fraksi sampel dikumpulkan dalam tabung reaksi atau labu erlenmeyer (17).

Kromatografi vakum memiliki keuntungan tersendiri yaitu sederhana, cepat, dan tepat. Jumlah maksimal sampel yang digunakan hampir sama dengan kromatografi kilat. Tetapi, tidak jarang digunakan sampel melebihi muatan untuk memisahkan campuran sederhana atau untuk menyederhanakan campuran senyawa untuk pemisahan yang lebih lanjut. Pada kondisi ini, muatan sampel dapat mencapai 10% (b/b) atau lebih dari massa sorbent. Dibandingkan dengan kromatografi kilat, pergantian pelarut lebih mudah karena bagian atas kolom memiliki tekanan atmosfer (18).

II.5.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif merupakan metode kromatografi yang digunakan untuk mempartisi sekelompok senyawa. Kromatografi jenis ini memiliki prinsip yang sama dengan metode Kromatografi Lapis Tipis pada umumnya, perbedaannya hanya terletak pada lempeng silika yang digunakan. Lempeng silika yang digunakan pada KLTP berukuran lebih besar daripada lempeng KLT serta lapisan silika pada permukaan lempeng lebih tebal, hal ini dimaksudkan agar senyawa yang terelusi dapat diambil dengan mudah. Senyawa yang telah terelusi dipisahkan dari lempeng dengan cara dikerok lalu diekstraksi dari serbuk silika dengan

kromatografi kolom atau dengan metode endap tuang menggunakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa secara sempurna tanpa melarutkan serbuk silikanya (16).

II.6 Elusidasi Struktur

Elusidasi struktur merupakan suatu prosedur yang bertujuan untuk menentukan rumus struktur dari suatu senyawa. Dalam mengelusidasi struktur kita memerlukan data spektrum dari sampel yang dianalisis, baik berupa spectrum spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, MS, dan NMR (23).

Metode yang digunakan dalam elusidasi struktur adalah sebagai berikut :

1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Daerah spektrum spektrofotometer yaitu 200-400 nm. Spektrofotometri UV-Vis dapat Memberikan informasi mengenai keberadaan gugus kromofor pada suatu molekul. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (24).

Prinsip kerjanya yaitu sampel dipapari dengan radiasi elektromagnetik berupa radiasi sinar ultraviolet yang kemudian

berinteraksi dengan molekul sampel sehingga molekul mengalami transisi elektronik, radiasi elektronik yang memapari molekul atau atom akan diserap oleh molekul atau atom dengan nilai serapan yang tergantung pada gugus kromofor yang terdapat dalam molekul atau atom tersebut. Serapan inilah yang kemudian terbaca oleh detektor sebagai nilai absorbansi dan nilai transmittan (30).

2. Spektroskopi FT-IR

Fourier Transform-Infra Red Spectroscopy (FT-IR) merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisa komposisi kimia dari senyawa-senyawa organik, polimer, coating atau pelapisan, material semikonduktor, sampel biologi, senyawa-senyawa anorganik, dan mineral. FT-IR mampu mendeterminasikan perbedaan gugus fungsional yang ada pada suatu senyawa. Spektroskopi FT-IR tidak hanya mempunyai kemampuan untuk analisa kualitatif, namun juga bisa untuk analisa kuantitatif (23, 24).

Prinsip kerjanya yaitu sampel diletakkan dalam suatu medan magnet kemudian ditembakkan radiasi sinar Inframerah yang menimbulkan eksitasi elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi atau lebih rendah, eksitasi tersebut akan melepaskan energi atau menyerap energi, energi inilah yang kemudian terbaca oleh detektor sebagai data spektra yang dapat mengkarakterisasi gugus fungsi dari sampel. Hanya frekuensi tertentu dari radiasi inframerah yang akan diserap oleh molekul,

radiasi dalam kisaran energi ini sesuai dengan kisaran frekuensi rintang dan vibrasi bengkokan dari ikatan kovalen dalam kebanyakan molekul. Namun, tidak semua ikatan dalam molekul dapat menyerap energi inframerah, meskipun radiasi tetap sesuai dengan gerakan ikatan (25).

3. NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)

Penggunaan NMR sekarang ini dapat diklasifikasikan ke dalam 2 kategori utama yakni (25):

1. Teknik satu dimensi: ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{14}C DEPT, ^{14}C PENDANT, ^{14}C J mod., NOE., dan seterusnya.
2. Teknik dua dimensi: ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H COSY-Ir, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^1H TOCSY (atau HOHAHA), ^1H - ^{14}C HMBC, ^1H - ^{14}C HMQC, ^1H - ^{14}C HSQC, HSQCTOCSY, dan sejenisnya.

Instrumen NMR Memberikan informasi mengenai nomor serta jenis proton, karbon dan unsur lain seperti nitrogen, fluorin, dan lain-lain yang ada pada suatu molekul dan hubungan antara atom-atom tersebut.

Prinsip kerja NMR yaitu suatu molekul diberikan efek gelombang elektromagnetik pada daerah frekuensi radio yang kemudian energi radiasi elektromagnetiknya akan diabsorpsi oleh inti atom berspin yang terdapat dalam molekul tersebut sehingga menimbulkan resonansi elektromagnetik, resonansi ini kemudian dapat terbaca oleh alat NMR sebagai peak frekuensi yang spesifik untuk tiap inti atom tertentu

tergantung pada gelombang elektromagnetik yang diabsorpsi serta nomor spin dari atom tersebut.

Tidak semua atom dapat terbaca oleh alat NMR (Nuclear Magnetic Resonance) hal ini dikarenakan tidak semua inti atom bermuatan mengalami perputaran (spin) pada sumbu inti atom tersebut, atom yang tidak berspin tidak akan menimbulkan dipol magnetik, oleh karena itu hanya atom-atom tertentu yang dapat terbaca oleh alat NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Hanya inti dengan nomor atom ganjil, nomor massa ganjil serta atom dengan nomor massa dan nomor atom ganjil yang menimbulkan dipol magnetik karena apabila jumlah proton dan neutron genap maka nilai spin (I) adalah nol (25).

4. Spektroskopi Massa (MS)

Spektroskopi Massa merupakan suatu metode analisis instrumental yang dipakai untuk identifikasi dan penentuan struktur dari komponen sampel dengan cara menunjukkan massa relatif dari molekul komponen dan massa relatif hasil pecahannya (25).