

**SINTESIS, ANALISIS KEMURNIAN, DAN
KARAKTERISASI SENYAWA 6,8-DIBROMO
KUERSETIN**

**HERMANTO UTOMO
N111 07 037**



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

**SINTESIS, ANALISIS KEMURNIAN, DAN
KARAKTERISASI SENYAWA 6,8-DIBROMO
KUERSETIN**

SKRIPSI

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

**HERMANTO UTOMO
N111 07 037**

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

**SINTESIS, ANALISIS KEMURNIAN, DAN KARAKTERISASI SENYAWA
6,8-DIBROMO KUERSETIN**

HERMANTO UTOMO

N111 07 037

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Kedua,

**Yusnita Rifai, M.Pharm., Ph.D., Apt.
Apt. NIP. 19751117 200012 2 001
001**

**Dra. Christiana Lethe, M.Si.,
NIP. 19481002 198203 2**

Pada tanggal

2013

PENGESAHAN

**SINTESIS, ANALISIS KEMURNIAN, DAN KARAKTERISASI SENYAWA
6,8-DIBROMO KUERSETIN**

Oleh :
HERMANTO UTOMO
N111 07 037

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

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua

Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt. :

2. Sekretaris

Dr. Mufidah, S.Si., M.Si., Apt. :

3. Ex Officio

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

4. Ex Officio

Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt. :

5. Anggota

Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., 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 di kemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Mei 2013

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Tiada hal yang paling indah selain menghaturkan puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi S1 penulis di Fakultas Farmasi tercinta.

Ucapan terima kasih dan rasa sayang yang tak terhingga kepada Ayahanda Mulyanto dan Ibunda Rosmawati yang merupakan sumber inspirasi terbaik dan motivator yang luar biasa bagi penulis selama ini. Terima kasih telah menjadi orang tua, pribadi, dan sahabat terbaik dalam hidup penulis.

Skripsi ini dapat penulis selesaikan berkat bantuan dari berbagai pihak baik langsung maupun tidak langsung. Karenanya patut rasanya penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada semua pihak, khususnya kepada ketiga pembimbing penulis yang merupakan sosok yang sangat inspiratif, Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing utama, Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Apt sebagai pembimbing pertama, dan Ibunda Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt. sebagai pembimbing kedua, atas segala motivasi, saran, waktu, dan perhatian yang telah beliau berikan kepada penulis sejak dimulainya penelitian hingga selesainya skripsi ini. Terima kasih juga penulis haturkan kepada Ibu Dr. Hj. Sartini M.Si., Apt. selaku penasehat akademik yang

telah mencurahkan perhatian dan bantuannya kepada penulis dan khusus untuk ibunda Dra.Christiana Lethe, M.Si., Apt yang senantiasa menjadi orang tua kedua, sahabat, dan motivator terbaik selama penulis berkuliah.

Juga tak lupa ucapan terima kasih penulis tujukan kepada Ibu Dekan, para Pembantu Dekan, Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, serta Bapak dan Ibu Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Kepada Kepala Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan Kepala Divisi Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin serta seluruh laboran yang telah membantu penulis selama pengerjaan penelitian ini, khususnya Ibu Adri, Kak Dewi, Arti, dan Kak Beti.

Kepada saudara-saudara tercintaku Serly Utomo, Selvia Utomo dan Cahyadi Utomo yang selalu berdiri hadir di sukacita hidupku.

Kepada sahabat phantom square: Ferry Novrianto, Stefanus Yudha, Christiady, Suhartono Citra, Morten Chandra, Verico Onardy, Oei Vina, Dan Ellen Noviana terima kasih untuk golden ways dan persahabatan yang seru dan indah.

Kepada kakak-kakak terbaik : Julianri Sari Lebang, Rahmawati Gani Meronda, Andi Affandi, Andi Arjuna, Rahmad Aksa, dan Lukman, terima kasih atas dukungan dan doanya.

Kepada sahabat-sahabatku: Muh. Syaiful, Mulyati Nur, Nurul Fitriah, Achmad Himawan, Muh Tri Hidayat, Ferliem, Budi Prasetya, Ardy

Novrianugrah, Fachril Thohari, Muh. Munthazir, Ismul Azham, Abdul Hamid, Bryan A.Futabara, Fitri Aqmalia, Trisnawardani, Nurwidya Nengsi, Ridha Sari Marsuki, Ismawati Tibe, Rugaya Y.M, Sari Fitriani, kepada saudara-saudari Mixtura 07 yang luar biasa dan seluruh warga mentari pagi, terima kasih untuk persahabatan yang tak terampuni.

Kepada seluruh Tim Asisten Kimia Analisis Farmasi, Analisis Farmasi, dan Sintesis Obat, terima kasih untuk sharing ilmu dan kerjasama yang sangat kompak dan membangun.

Banyak hal yang membuat karya ini jauh dari kesempurnaan. Karena itu, penulis selalu berharap agar saran yang membangun selalu disampaikan kepada penulis demi terciptanya suatu karya yang lebih bermutu. Permohonan maaf yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada semua pihak yang mungkin pernah dirugikan oleh penulis. Akhirnya semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Mei 2013

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian sintesis, analisis kemurnian, dan karakterisasi senyawa 6,8-dibromo kuersetin. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis, analisis kemurnian, dan karakterisasi terhadap senyawa 6,8-dibromo kuersetin dengan menggunakan berbagai teknik spektroskopik untuk memperoleh senyawa murni tersebut. Kuersetin sebagai bahan baku utama dibrominasi menggunakan larutan Bromin dalam asam asetat glasial pada suhu 35°-40°C selama satu jam, kemudian dimurnikan dengan metode kromatografi kolom. Kemurnian dari senyawa dilihat menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Produk yang diperoleh kemudian dikarakterisasi dengan beberapa metode spektroskopi meliputi UV-VIS, FT-IR, ¹H-NMR, dan ESI-MS. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa produk yang diperoleh adalah 6,8-dibromo kuersetin dengan persen rendemen sebesar 32,47%.

ABSTRACT

The research concerning on synthesis, purity analysis, and characterization of 6,8-dibromo quercetin has been conducted. This study aimed to perform the synthesis, purity analysis, and characterization of the 6,8-dibromo quercetin using various spectroscopic techniques in order to obtain the pure compound. Quercetin as starting material was brominated using bromine solution in glacial acetic acid at 35 °- 40 °C for one hour, then was purified using flash column chromatography (FCC) method. Purity of compound was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC). The product then was characterized by several spectroscopic methods including UV-VIS, FT-IR, ¹H-NMR, and ESI-MS. The results showed that the product obtained was 6,8-dibromo quercetin with yield percentage was 32.47% .

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Kuersetin dan Turunannya	4
II.1.1 Kuersetin	4
II.1.2 Turunan Kuersetin	5
II.2 Sintesis Senyawa Kimia	5
II.2.1 Sintesis	5
II.2.2 Desain Obat.....	6
II.3 Analisis Kemurnian.....	7
II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis	7

II.3.2 Kromatografi Kolom.....	9
II.4 Karakterisasi Senyawa.....	10
II.4.1 Spektrofotometri UV-VIS	10
II.4.1.1 Teori Spektrofotometri	10
II.4.1.2 Prinsip Kerja	11
II.4.2 Spektrofotometri <i>Fourier Transform-Infra Red</i> (FT-IR)	12
II.4.3 Spektroskopi Proton- <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	15
II.4.3.1 Asal-Usul Gejala Resonansi Magnetik Nuklir	15
II.4.3.2 Spektrum Resonansi Nuklir Magnetik.....	17
II.4.3.3 Keekivalenan Proton	18
II.4.3.4 Pola Pemisahan Proton.....	19
II.4.3.5 Instrumentasi <i>Proton-Nuclear Magnetic Resonance</i>	20
II.4.4 <i>Electrospray Ionization Mass Spectroscopy</i> (ESI-MS)	20
BAB III METODE PENELITIAN	23
III.1 Alat dan Bahan	23
III.2 Cara Kerja	23
III.2.1 Sintesis Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	23
III.2.2 Analisis Kemurnian Senyawa 6,8 Dibromo Kuersetin	24
III.2.2.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	24
III.2.2.2 Kromatografi Kolom.....	24
III.2.3 Karakterisasi Senyawa 6,8 Dibromo Kuersetin.....	26
III.2.3.1 Spektrofotometri UV-VIS	26
III.2.3.2 Spektrofotometri <i>Fourier Transform-Infra Red</i> (FT-IR)	27

III.2.3.3 Spektroskopi <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	27
III.2.3.4 <i>Electrospray Ionization Mass Spectroscopy</i> (ESI-MS)	28
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	29
IV.1 Hasil Penelitian	29
IV.2 Pembahasan.....	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
V.1 Kesimpulan	36
V.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1 Skema Reaksi Sintesis Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	29
2 Pemerian Senyawa Kuersetin dan 6,8-Dibromo Kuersetin	29
3 Rendemen Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	30
4 Hasil KLT dan Spektrofotometri UV-Vis Senyawa Kuersetin dan 6,8-Dibromo Kuersetin	30
5 Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR senyawa Kuersetin	30
6 Hasil Pengukuran Spektrofotometri IR senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	31
7 Hasil Pengukuran Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan ESI-MS Senyawa Kuersetin dan 6,8-Dibromo Kuersetin	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	40
2. Perhitungan Rendemen Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	41
3. Gambar Hasil Penelitian	43
4. Gambar Senyawa Kuersetin dan 6,8-Dibromo Kuersetin	48
5. Gambar Instrumen	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Reaksi Sintesis Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	43
2 Kromatogram Senyawa Hasil Sintesis	43
3 Kromatogram Senyawa Sintetik murni	44
4 Spektra UV-Vis Senyawa Kuersetin	44
5 Spektra UV-Vis Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	45
6 Spektra IR Senyawa Kuersetin	45
7 Spektra IR Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	46
8 Spektra $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Kuersetin	46
9 Spektra $^1\text{H-NMR}$ Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	47
10 Spektra ESI-MS Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	47
11 Senyawa Kuersetin	48
12 Senyawa 6,8-Dibromo Kuersetin	48
13 Instrumen Kromatografi Kolom	49
14 Instrumen Spektrofotometer FT-IR	49
15 Instrumen Spektrofotometer UV-VIS	50
16 Instrumen Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$	50
17 Instrumen Spektroskopi ESI-MS	51

BAB I

PENDAHULUAN

Umat manusia dalam kehidupannya dikelilingi oleh sumber alam hayati dan telah digunakan sejak lama untuk obat-obatan dalam menyembuhkan berbagai penyakit. Namun, jika sumber tersebut terus menerus digunakan maka akan mengalami kekurangan dan berdampak negatif bagi ekosistem. Oleh karena itu, berbagai metode pendekatan yang dilakukan untuk penemuan dan pengembangan obat baru, salah satunya yaitu sintesis dari modifikasi struktur molekul senyawa yang telah diketahui aktivitas biologisnya yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, masa kerja yang lebih panjang, tingkat keamanan yang lebih tinggi, lebih selektif dan lebih stabil (1).

Kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang memiliki inti flavon yang terbentuk dari dua cincin benzen yang terhubung melalui jembatan oksigen membentuk cincin heterosiklik. Kuersetin dan glikosidanya banyak terdapat di dalam tumbuhan dan merupakan senyawa flavonoid yang jumlahnya paling melimpah yaitu sekitar 65-70% dari flavonoid yang terdapat di alam. Kuersetin diketahui memiliki beberapa efek farmakologis, salah satunya yaitu efek anti-diabetes dengan menghambat kerja dari enzim α -glukosidase. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kuersetin memiliki kemampuan

menghambat aktivitas enzim α -glukosidase sebesar 75,7% pada dosis 10 $\mu\text{g/mL}$ (2,3,4).

α -glukosidase adalah enzim yang ditemukan di dalam saluran pencernaan yang berfungsi untuk memecah karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana yang akan diserap. Penghambat α -glukosidase bekerja dengan menghalangi penyerapan karbohidrat pada saluran pencernaan, sehingga mengurangi peningkatan kadar glukosa setelah makan (postprandial) di dalam darah (5,6).

Untuk meningkatkan potensi atau optimasi senyawa kuersetin, *Computer-Aided Drug Design and Development* (CADD) yang merupakan salah satu alat bantu untuk rancangan obat secara rasional, digunakan untuk merancang turunan kuersetin berdasarkan bentuk pengikatan dan interaksi dengan situs pengikatan dari α -glukosidase dengan metode simulasi *docking* menggunakan Arguslab[®] 4.0.1. Salah satu turunan kuersetin yang telah diprediksi memiliki aktivitas lebih baik dibanding senyawa induknya (kuersetin) yakni 6,8-dibromo kuersetin dengan nilai energi interaksi -12,11 kkal/mol sedangkan kuersetin dengan energi interaksi -10.61 kkal/mol terhadap situs pengikatan dari α -glukosidase (7).

Tujuan penelitian ini adalah melakukan sintesis, analisis kemurnian, dan karakterisasi terhadap senyawa 6,8-dibromo kuersetin dengan menggunakan berbagai teknik spektroskopik.

Manfaat dari penelitian ini adalah menambah informasi tentang proses sintesis, analisis kemurnian, dan karakterisasi senyawa turunan kuersetin (6,8-dibromo kuersetin) dan memperoleh senyawa murni 6,8-dibromo kuersetin yang digunakan sebagai bahan uji untuk eksperimen secara *in vitro* terhadap α -glukosidase secara langsung guna membuktikan hasil prediksi berdasarkan hasil simulasi *docking* tersebut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II. 1 Kuersetin dan Turunannya

II.1.1 Kuersetin

Kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid yang memiliki inti flavon yang terbentuk dari dua cincin benzen yang terhubung melalui jembatan oksigen membentuk cincin heterosiklik (3). Nama IUPAC kuersetin adalah (2-(3',4'-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-Kromon-4-on), dengan rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$, massa molar 302,236 g/mol, kerapatan curah $1,799 \text{ g/cm}^3$, dan titik leleh $316 \text{ }^\circ\text{C}$ (11).

Kuersetin dan glikosidanya banyak terdapat di dalam tumbuhan dan merupakan senyawa flavonoid yang jumlahnya paling melimpah yaitu sekitar 65-70% dari flavonoid yang terdapat di alam. Kuersetin merupakan golongan flavonoid dilaporkan menunjukkan beberapa aktivitas biologi. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan kuersetin, antara lain karena kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superoksida dan radikal hidroksil (3). Beberapa efek farmakologis senyawa kuersetin yaitu sebagai obat antidiabetik, prostatitis, penyakit hati, katarak, antiinflamasi, antialergi, anti kanker, bronkhitis, dan asma (11)

II.1.2 Turunan Kuersetin

Salah satu modifikasi molekul kuersetin yang sudah dilakukan adalah dengan klorinasi menggunakan asam hipoklorit menghasilkan 6-klorokuersetin dan 6,8-diklorokuersetin dengan aktivitas antioksidan lebih tinggi dari senyawa induknya. Senyawa 6-klorokuersetin ini menunjukkan aktivitas perlindungan terhadap tukak lambung yang diinduksi asetosal lebih tinggi dibanding kuersetin. (12)

Kuersetin diketahui memiliki beberapa efek farmakologis, salah satunya yaitu efek anti-diabetes dengan menghambat kerja dari enzim α -glukosidase. Untuk meningkatkan potensi atau optimasi senyawa kuersetin, *Computer-Aided Drug Design and Development* (CADD) yang merupakan salah satu alat bantu untuk rancangan obat secara rasional, digunakan untuk merancang turunan kuersetin berdasarkan bentuk pengikatan dan interaksi dengan situs pengikatan dari α -glukosidase dengan metode simulasi *docking*. Salah satu turunan kuersetin yang diprediksi memiliki aktivitas lebih baik dibanding senyawa induknya (kuersetin) yakni 6,8-dibromo kuersetin (7).

II.2 Sintesis Senyawa Kimia

II.2.1 Sintesis

Sintesis merupakan perubahan struktur senyawa asal menjadi senyawa target yang sama sekali berbeda dengan senyawa asalnya. Sebagai contoh perubahan senyawa metabolit sekunder menjadi berbagai bentuk senyawa penting. Sintesis senyawa target mempunyai banyak

langkah reaksi. Hasil reaksi dari langkah reaksi pertama merupakan zat antara untuk langkah reaksi berikutnya. Untuk menyederhanakan langkah reaksi ini dapat dimungkinkan sintesis dimulai dari senyawa hasil alam sebagai senyawa kunci (1).

Ada jutaan senyawa kimia telah diketahui, namun yang merupakan senyawa kunci hanya sebagian kecil saja. Senyawa kunci merupakan senyawa kimia yang dapat digunakan untuk mensintesis senyawa kimia lain dan menghasilkan bahan kimia penting bagi kehidupan umat manusia (1).

Kekayaan alam nabati Indonesia melimpah ruah, dan telah digunakan sejak dahulu untuk pengobatan dalam menyembuhkan berbagai penyakit. Namun, jika sumber tersebut terus menerus digunakan maka akan mengalami kekurangan dan berdampak negatif bagi ekosistem. Oleh karena itu, berbagai metode pendekatan yang dilakukan untuk penemuan dan pengembangan obat baru, salah satunya yaitu sintesis dari modifikasi struktur molekul senyawa yang telah diketahui aktivitas biologisnya yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi, masa kerja yang lebih panjang, tingkat keamanan yang lebih tinggi, lebih selektif dan lebih stabil (1).

II.2.2 Desain Obat

Desain obat dimulai dengan menemukan senyawa yang menunjukkan sifat biologi penting dan diakhiri dengan langkah optimasi, baik dari profil aktivitas maupun sintesis senyawa kimia. Dengan kimia

komputasi, peneliti menggunakan komputer untuk mengoptimasi aktivitas, geometrik dan reaktivitas, sebelum senyawa disintesis secara eksperimental. Hal ini dapat menolong dalam mensintesis senyawa yang membutuhkan waktu yang sangat lama dan biaya yang tidak sedikit (13).

Optimasi aktivitas sering kali menggunakan pendekatan struktur molekul obat yang disesuaikan dengan struktur target. Struktur target merupakan suatu protein baik berupa reseptor atau enzim ataupun DNA yang dapat ditentukan dan dapat diidentifikasi menggunakan perangkat bioinformatik atau aktivitas farmakologiknya. Jika struktur dari target telah diketahui misalnya ditentukan dengan cara *Xray crystallography* atau spektroskopi NMR, maka akan dapat ditentukan molekul obat yang dapat secara tepat masuk ke dalam *binding sites* dari target, sehingga kita mampu melakukan simulasi untuk membuktikan adanya interaksi antara obat dengan targetnya. Hasilnya adalah mendapatkan usulan senyawa yang memiliki aktivitas yang lebih baik dan siap disintesis (13,14).

II.3 Analisis Kemurnian

II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan yang memerlukan investasi yang kecil untuk perlengkapannya, menggunakan waktu yang singkat serta pemakaian pelarut dan cuplikan dalam jumlah sedikit. KLT termasuk kromatografi serapan, dimana sebagai fase diam berupa zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fase gerak adalah zat cair yang disebut larutan pengembang (15).

a. Fase diam (Lapisan Penyerap)

Pada kromatografi lapis tipis, fase diam berupa lapisan tipis yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari plat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum (pati). Penyerap yang umum dipakai untuk kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, kieselgur, dan selulosa (15).

Dua sifat yang penting dari fase diam adalah ukuran partikel dan homogenitasnya, karena adhesi terhadap penyokong sangat tergantung pada kedua sifat tersebut. Ukuran partikel yang biasa digunakan adalah 1-25 mikron. Partikel yang butirannya sangat kasar tidak akan memberikan hasil yang memuaskan dan salah satu cara untuk memperbaiki hasil pemisahan adalah dengan menggunakan fase diam yang butirannya lebih halus. Butiran yang halus memberikan aliran pelarut yang lebih lambat dan resolusi yang lebih baik (15).

b. Fase gerak (Pelarut Pengembang)

Fase gerak ialah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Jika diperlukan sistem pelarut multi komponen, harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga komponen (15).

c. Harga Rf

Untuk menggambarkan jarak pengembangan senyawa pada kromatogram dipakai istilah harga Rf (16).

$$Rf = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak garis depan pelarut dari titik awal}}$$

II.3.2 Kromatografi Kolom

Teknik pemisahan kromatografi kolom dalam memisahkan campuran, kolom yang telah dipilih sesuai ukuran diisi dengan bahan penyerap (adsorben) seperti alumina dalam keadaan kering atau dibuat seperti bubuk dengan pelarut. Pengisian dilakukan dengan bantuan batang pemampat (pengaduk) untuk memampatkan adsorben dengan gelas wool pada dasar kolom. Pengisian harus dilakukan secara hati-hati dan sepadat mungkin agar rata sehingga terhindar dari gelembung-gelembung udara. Untuk membantu homogenitas pengepakan biasanya kolom setelah diisi divibrasi, diketok-ketok atau dijatuhkan lemah pada pelat kayu. Sejumlah cuplikan dilarutkan dalam sedikit pelarut, dituangkan melalui sebelah atas kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam adsorben. Komponen-komponen dalam campuran diadsorpsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada permukaan atas kolom, dengan penambahan pelarut (eluen) secara terus-menerus, masing-masing komponen akan bergerak turun melalui kolom dan pada bagian atas kolom akan terjadi kesetimbangan baru antara bahan penyerap, komponen campuran dan eluen. Kesetimbangan dikatakan

tetap bila suatu komponen yang satu dengan lainnya bergerak ke bagian bawah kolom dengan waktu atau kecepatan berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan. Jika kolom cukup panjang dan semua parameter pemisahan betul-betul terpilih seperti diameter kolom, adsorben, pelarut dan kecepatan alirannya, maka akan terbentuk pita-pita (zona-zona) yang setiap zona berisi satu macam komponen. Setiap zona yang keluar dari kolom dapat ditampung dengan sempurna sebelum zona yang lain keluar dari kolom (17).

II.4 Karakterisasi Senyawa

II.4.1 Spektrofotometri UV-VIS

II.4.1.1 Teori Spektrofotometri

Dalam analisis spektrofotometri digunakan suatu sumber radiasi yang menyorok ke dalam daerah ultraviolet spektrum itu. Dari spektrum ini, dipilih panjang-panjang gelombang tertentu dengan lebar pita kurang dari 1 nm. Instrumen yang digunakan untuk maksud ini adalah spektrofotometer, yaitu instrument yang terdiri dari dua instrument dalam satu kotak sebuah spektrometer dan sebuah fotometer.

Sebuah spektrofotometer dapat dianggap sebagai sebuah fotometer fotolistrik yang diperhalus yang memungkinkan penggunaan pita-pita cahaya yang sinambung variabelnya dan lebih mendekati monokromatik. Bagian-bagian penting spektrofotometer adalah : suatu sumber energi cahaya; sebuah monokromator, yakni suatu piranti untuk memencilkan cahaya monokromatik; kuvet kaca atau silica untuk pelarut

dan larutan yang dituju dan sebuah peranti untuk menerima atau mengukur berkas-berkas energi cahaya yang melewati pelarut atau larutan (18)

Spektrofotometer UV-Vis adalah alat instrument analisis yang bekerja berdasarkan prinsip kolorimetri yaitu metode yang menyatakan bahwa warna yang timbul pada larutan contoh tergantung pada kepekatan konsentrasi suatu unsur. Metode analisis ini didasarkan pada pengukuran energy cahaya tampak atau cahaya ultraviolet oleh suatu senyawa sebagai fungsi dari panjang gelombang (19).

II.4.1.2 Prinsip Kerja

Spektra UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kuantitatif. Suatu berkas dikenakan pada cuplikan (larutan sampel) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh cuplikan ditentukan dengan membandingkan intensitas sinar yang diteruskan dengan intensitas sinar yang diserap jika tidak ada spesies penyerap lainnya. Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton yang melalui satu satuan luas penampang perdetik. Serapan dapat terjadi jika foton/radiasi yang mengenai cuplikan memiliki energi yang sama dengan energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan tenaga. Kekuatan radiasi juga mengalami penurunan dengan adanya penghamburan dan pemantulan cahaya, akan tetapi penurunan karena hal ini sangat kecil dibandingkan dengan proses penyerapan (20).

II.4.2 Spektrofotometri *Fourier Transform-Infra Red* (FT-IR)

Sinar infra merah mempunyai panjang gelombang lebih panjang dibandingkan dengan UV-Vis, sehingga energinya yang lebih rendah dengan bilangan gelombang $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ atau sekitar $(1,7 \times 10^{-3}\text{ cm}$ sampai dengan $2, \times 10^{-4}\text{ cm})$. Sinar infra merah hanya dapat menyebabkan vibrasi (getaran) pada ikatan baik berupa rentangan (*stretching= str*) maupun berupa bengkokan (*bending=bend*). Energi vibrasi untuk molekul adalah spesifik yang berarti bilangan gelombangnya spesifik. Namun pada prakteknya spektroskopi IR lebih diperuntukkan untuk menentukan adanya gugus-gugus fungsional utama dalam suatu sampel yang diperoleh berdasarkan bilangan gelombang yang dibutuhkan untuk vibrasi tersebut (21).

Frekuensi dari ikatan dipengaruhi oleh atom-atom atau gugus-gugus sekelilingnya, namun demikian ikatan rangkap dua atau tiga lebih kuat daripada ikatan tunggal seperti C-H, N-H, O-H, C-C dan lain-lain timbul antara $3600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, gugus karbonil memberikan vibrasi ukur antara $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, hal ini tentunya juga bergantung pada sekelilingnya. Daerah dibawah 1600 cm^{-1} adalah pita-pita ikatan tunggal dari C-C, C-N, C-O, C-Halogen dan lain-lain (22).

Pengertian *Overtone* adalah frekuensi yang besarnya dua kali frekuensi vibrasi normal dan intensitas pitanya kecil contohnya *overtone* dari karbonil 1716 cm^{-1} absorpsi *overtone*nya 3430 cm^{-1} , bisa saja tumpang tindih dengan absorpsi dari gugus hidroksi. Pengertian

“*combination tone*” adalah pita yang kecil kadang kadang timbul dengan besaran frekuensinya merupakan penjumlahan atau pengurangan dari dua atom lebih pita fundamental ($X+Y$) atau ($X-Y$) cm^{-1} (22).

Serapan pada sekitar $1200-500 \text{ cm}^{-1}$ merupakan sidik jari dari molekul dan serapannya sangat kompleks biasanya digunakan untuk mengkonfirmasi apakah gugus fungsi utamanya ada. Misalnya bila molekul mempunyai gugus fungsional hidroksi (-OH) pada sekitar 3400 cm^{-1} biasanya intensitasnya kuat dengan puncak melebar, dan akan diperkuat serapan C-O tunggal pada sekitar 1200 cm^{-1} yang tajam dan intensitasnya kuat (21).

Menganalisis spektra IR dimulai dari kiri ke kanan atau dari bilangan gelombang yang lebih besar ke kecil. Serapan suatu gugus fungsional biasanya tidaklah eksak (tunggal), tapi dapat berupa interval bilangan gelombang (21).

Berikut adalah beberapa serapan yang spesifik pada spektra IR berdasarkan gugus fungsional (21) :

1. Aromatik

Untuk aromatik akan muncul serapan dari ikatan rangkap C=C pada sekitar 1600 cm^{-1} dan dari =C-H ($\text{Sp}^2\text{-s}$) pada sekitar 3000 cm^{-1}

2. Alkena dan Alkuna

Alkena pada umumnya mirip dengan aromatik yaitu munculnya serapan C=C pada sekitar 1600 cm^{-1} dan serapan =C-H ($\text{Sp}^2\text{-s}$).

Sedangkan serapan alkuna C≡C pada sekitar 2200 cm⁻¹ dan serapan =C-H (Sp²-s) pada sekitar 3300 cm⁻¹

3. Karbonil

Ada beberapa senyawa karbonil (C=O) yang akan memunculkan interval bilangan gelombang antara 1820-1600 cm⁻¹ sebagai berikut :

- a. Asam karboksilat akan memunculkan serapan OH pada bilangan gelombang 3500-3300 cm⁻¹
- b. Amida akan muncul serapan N-H yang medium dan tajam pada sekitar 3500 cm⁻¹
- c. Ester akan memunculkan serapan C-O tajam dan kuat pada 1300-1000 cm⁻¹
- d. Anhidrida akan memunculkan serapan C=O kembar 1810 cm⁻¹ dan 1700 cm⁻¹ dan akan lebih spesifik bila menggunakan FT-IR
- e. Aldehida akan memunculkan C-H aldehida intensitas lemah tapi tajam pada 2850-2700 cm⁻¹ baik yang simetri maupun anti simetri
- f. Keton bila semua yang diatas tidak muncul

4. Alkohol dan Fenol

Kedua golongan senyawa ini akan memunculkan serapan (O-H) pada sekitar 3500-3300 cm⁻¹ dengan intensitas kuat dan melebar.

5. Amina

Akan muncul serapan N-H pada sekitar 3500 cm⁻¹ dan biasanya dikonfirmasi dengan amida

Kelima golongan senyawa diatas merupakan gugus fungsional utama dan spesifik. Banyak gugus fungsi lain tapi kurang spesifik seperti eter C-O yang juga terdapat pada alkohol dan ester, alkana yaitu C-C tunggal dan -C-H (Sp^3 -s) yang hampir dimiliki semua senyawa organik sehingga tidak akan memberikan informasi yang bermanfaat bila dianalisis dengan spektroskopi IR (21).

Sistem *fourier transform* adalah salah satu bagian dari desain spektrofotometer tipe multipleks, subklas nondispersi. Peralatan analitik multipleks adalah alat saluran tunggal (*single channel*) dimana komponen sinyal diteliti secara simultan. Untuk menentukan *magnitude* tiap komponen tersebut sinyal analisis harus disesuaikan hingga memungkinkan pengkodean sinyal untuk mengetahui komponennya. Kebanyakan alat multipleks bergantung pada fourier transform untuk mengkode sinyal dan biasanya disebut alat *fourier transform (Fourier Transform Instrument)* (23).

II.4.3 Spektroskopi *Proton-Nuclear Magnetic Resonance* ($^1\text{H-NMR}$)

II.4.3.1 Asal-Usul Gejala Resonansi Magnetik Nuklir

Inti-inti atom unsur-unsur dapat dikelompokkan sebagai mempunyai spin atau tidak mempunyai spin. Suatu inti berspin akan menimbulkan medan magnet kecil yang diperikan oleh suatu momen magnetik nuklir, suatu vektor. Dalam spektroskopi NMR, suatu medan magnet luar diciptakan oleh suatu medan magnet tapal kuda permanen atau suatu elektromagnet. Kuat medan magnet luar ini dilambangkan dengan H_0 , dan

arahnya dinyatakan oleh sebuah anak panah. Proton yang bergasing dengan momen magnetik nuklirnya, dalam banyak hal, mirip dengan suatu batang magnet kecil. Bila molekul yang mengandung atom-atom hidrogen ditaruh dalam medan magnetik luar, maka momen magnetik dari tiap inti hidrogen atau proton, mengambil salah satu dari dua sikap yaitu paralel atau anti paralel terhadap medan luar (24).

Dalam keadaan paralel arah momen magnetik proton sama dengan arah medan luar. Dalam keadaan anti paralel momen magnetik proton berlawanan arah dengan medan luar. Keadaan paralel suatu proton lebih stabil (berenergi lebih rendah) dibandingkan dengan keadaan anti paralel. Bila dikenai gelombang radio yang frekuensinya cocok, momen magnetik dari sebagian kecil proton paralel akan menyerap energi dalam membalik atau jungkir balik (*flip*) menjadi keadaan antiparalel yang energinya lebih tinggi. Banyaknya energi yang diperlukan untuk membalik momen magnetik sebuah proton dari paralel ke antiparalel bergantung sebagian pada besarnya H_0 . Jika H_0 dibesarkan maka inti itu lebih bertahan untuk dijungkirbalikkan dan diperlukan radiasi berfrekuensi lebih tinggi (24).

Bila gabungan khusus antara kuat medan magnet luar dan radio frekuensi menyebabkan suatu proton berpindah dari keadaan paralel menjadi antiparalel maka dikatakan proton itu dalam resonansi. Istilah resonansi nuklir magnetik berarti "inti-inti dalam resonansi dalam medan magnet" (24).

II.4.3.2 Spektrum Resonansi Nuklir Magnetik

Bila inti dengan spin diletakkan diantara kutub-kutub magnet yang sangat kuat maka inti akan menjajarkan medan magnetiknya sejajar atau melawan medan magnet. Dengan menerapkan energi dalam kisaran frekuensi radio, kita dapat mengeksitasi inti pada keadaan spin yang berenergi lebih rendah ke spin yang berenergi lebih tinggi. Membaliknya inti dari keadaan paralel ke antiparalel memberikan penyerapan energi yang akan dideteksi dengan suatu indikator daya (25).

Dalam satu macam spektrometer, radio-frekuensinya dibuat tetap pada 60 MHz sedangkan H_0 diubah-ubah dalam suatu range kecil dan frekuensi absorpsi energi direkam untuk pelbagai harga H_0 . Jadi, spektrum NMR adalah banyaknya energi yang diserap berbanding dengan kuat medan magnet. Dalam suatu spektrum NMR, posisi serapan sebuah proton bergantung pada kuat netto medan magnet lokal yang mengitarinya. Medan lokal ini merupakan hasil medan terapan H_0 dan medan molekul terimbas yang mengitari proton itu dan berlawanan dengan medan magnet terapan. Jika medan imbasan proton itu relatif kuat maka medan itu melawan H_0 dengan lebih kuat dan diperluas medan terapan yang lebih besar untuk membawa proton itu agar beresonansi. Dalam hal ini, proton dikatakan terperisai (*shielded*) dan absorpsinya terletak diatas medan dalam spektrum itu. Atau sebaliknya jika media imbasan disekitar proton itu relatif lemah, maka medan yang dipakai juga

lemah dan membawa proton ini ke dalam resonansi. Proton itu dikatakan tak terperisai (*deshielded*) dan absorpsinya muncul dibawah medan.

Terperisai dan tak terperisai adalah istilah relatif. Untuk memperoleh pengukuran yang kuantitatif diperlukan suatu titik rujukan. Senyawa yang dipilih untuk titik rujukan adalah tetrametilsilena (TMS), yang proton-protonnya menyerap pada ujung kanan dalam spektrum NMR. Absorpsinya kebanyakan proton lain dijumpai dibawah medan absorpsi TMS. Dalam praktek, TMS ditambahkan langsung pada contoh, dan peak TMS bersama dengan peak-peak absorpsi dari senyawa contoh diperoleh dalam spektrum. Selisih antar posisi absorpsi TMS dan posisi absorpsi suatu proton tertentu disebut geseran kimia (*chemical shift*) (24).

II.4.3.3 Keekivalenan Proton

Setiap proton atau kelompok proton pada molekul organik mempunyai lingkungan kimia yang spesifik sehingga harga δ juga akan spesifik. Kelompok proton adalah sejumlah proton yang mempunyai harga δ yang sama. Bila lingkungan kimianya makin elektropositif artinya makin terperisai maka harga δ akan menuju TMS, sedangkan bila lingkungannya makin elektronegatif maka proton makin tak terperisai maka harga δ akan makin jauh dari TMS. Dengan demikian bisa saja terjadi perbedaan harga δ untuk kelompok proton yang sama bila lingkungan kimianya berbeda (26).

II.4.3.4 Pola Pemisahan Proton (24)

a. Singlet

Sebuah proton yang tidak memiliki proton tetangga yang secara magnetik tak-ekuivalen dengannya, akan menunjukkan sebuah peak tunggal, yang disebut singlet dalam spektrum NMR.

b. Doblet

Sebuah proton yang memiliki satu proton tetangga yang tidak ekuivalen dengannya akan memberikan suatu isyarat yang terbelah menjadi satu peak rangkap atau disebut doblet.

c. Triplet

Sebuah proton (H_a) yang memiliki dua proton tetangga yang saling ekuivalen satu sama lain namun tidak ekuivalen dengannya, maka isyarat NMR dari H_a adalah triplet. Jika kedua proton tersebut ditandai dengan H_b , ekuivalen, maka keduanya memberikan satu sinyal terpisah oleh H_a menjadi suatu doblet.

d. Kuartet

Suatu senyawa yang mengandung gugus metil dan satu proton (H_a) pada karbon didekat gugus metil. Proton ini tak-ekuivalen dengan proton-proton metil. Ketiga proton metil (H_b) yang ekuivalen mempunyai satu proton tetangga dan muncul sebagai sebuah doblet dalam spektrum. Isyarat yang ditimbulkan oleh H_a muncul sebagai suatu kuartet karena H_a memiliki tiga proton tetangga.

II.4.3.5 Instrumentasi Spektroskopi *Proton-Nuclear Resonance*

(¹H-NMR) (26)

Tabung kaca berbentuk silindris berisis sampel yang dilarutkan dalam pelarut tanpa proton ditambah dengan TMS sebagai standar internal. Tabung sampel ditempatkan diantara dua kutub magnet kemudian diputar agar semua bagian sampel dipengaruhi oleh medan magnet (homogen). Pada celah magnet terdapat kumparan dengan generator frekuensi, 60 MHz dengan H_0 yaitu 14.100 Gauss atau alat terbaru 100 MHz dengan H_0 yaitu 51.480 Gauss. Kumparan ini akan memberikan tenaga elektromagnetik yang digunakan untuk merubah orientasi spin. Bila sampel menyerap radiasi maka putaran akan menghasilkan sinyal frekuensi radio pada bidang kumparan detektor dan akan memberikan respon dan mencatatnya sebagai sinyal resonansi magnet inti berupa puncak.

II.4.4 *Electrospray Ionization Spectroscopy (ESI-MS)* (27)

Sampel dimasukkan, diuapkan dan terumpan dalam suatu aliran sinambung kedalam kamar pengionan. Kamar pengionan sebagai ditaruh dalam vakun untuk meminimalkan tabrakan dan reaksi antara radikal, molekul udara, dan lain-lain. Dalam kamar ini, contoh melewati suatu aliran elektron berenergi tinggi, yang menyebabkan ionisasi beberapa molekul sampel menjadi ion-ion molekul.

Setelah terbentuk, sebuah ion molekul dapat mengalami fragmentasi dan penataan ulang. Proses-proses ini berjalan sangat cepat ($10^{-10} - 10^{-6}$ det). Partikel yang berumur lebih panjang dapat dideteksi oleh pengumpul ion, sedangkan yang berumur lebih pendek mungkin tak sempat mencapai pengumpul ion. Dalam beberapa hal, ion molekul terlalu pendek usianya sehingga tak dapat dideteksi, dan hanya produk-produk berfragmentasinya yang menunjukkan peak.

Segara radikal-radikal dan partikel-partikel lain itu terbentuk, mereka diumpamakan melewati dua elektroda, lempeng pempercepat ion, yang pempercepat partikel bermuatan positif. (Partikel yang bermuatan negatif dan netral tak dipercepat dan terus-menerus dibuang oleh pompa vakum). Dari lempeng pempercepat, partikel bermuatan positif menuju ke tabung analisator, dimana partikel-partikel ini dibelokkan oleh medan magnet sehingga lintasannya melengkung.

Jari-jari lintasan melengkung bergantung pada kecepatan partikel dan kuat medan magnet yang selanjutnya ditentukan voltase pempercepat dan m/e partikel. Pada kuat medan dan voltase yang sama, partikel dengan m/e tinggi akan memiliki jari-jari yang lebih besar, sedangkan yang m/e -nya rendah akan mempunyai jari-jari rendah pula. Oleh karena itu, aliran terus-menerus partikel bermuatan positif lewat tabung analisator membentuk suatu pola; partikel dengan m/e tinggi memiliki jari-jari besar, partikel dengan m/e rendah memiliki jari-jari kecil. Jika voltase pempercepat dikurangi perlahan-lahan dan secara sinambung, kecepatan

semua partikel akan berkurang, dan jari-jari lintasan semua partikel juga berkurang. Dengan teknik ini, partikel berturut-turut mengenai detektor dimulai dengan m/e rendah. Efek yang sama dapat diperoleh dengan menaikkan kuat medan magnet, sebagai ganti menurunkan voltase pemercepat.