

**ANALISIS KARAKTERISASI ENANTIOMER SENYAWA
MMEO (3'-METOKSI-3'', 4''-(METILENDIOKSI)-2, 5-
EPOKSILIGNAN-4'OL-6-ON)**

**CHARACTERIZATION ANALYSIS OF MMEO (3'-
METHOXY-3'', 4''-(METHYLENEDIOXY)-2, 5-
EPOXYLIGNAN-4'OLE-6-ONE) ENANTIOMER**

**CECILIA CHERYL LIYADI
N111 16 044**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**ANALISIS KARAKTERISASI ENANTIOMER SENYAWA
MMEO (3'-METOKSI-3'', 4''-(METILENDIOKSI)-2, 5-
EPOKSILIGNAN-4'OL-6-ON)**

**CHARACTERIZATION ANALYSIS OF MMEO (3'-
METHOXY-3'', 4''-(METHYLENEDIOXY)-2, 5-
EPOXYLIGNAN-4'OLE-6-ONE) ENANTIOMER**

**CECILIA CHERYL LIYADI
N111 16 044**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**ANALISIS KARAKTERISASI ENANTIOMER SENYAWA
MMEO (3'-METOKSI-3'', 4''-(METILENDIOKSI)-2, 5-
EPOKSILIGNAN-4'OL-6-ON)**

**CHARACTERIZATION ANALYSIS OF MMEO (3'-
METHOXY-3'', 4''-(METHYLENEDIOXY)-2, 5-
EPOXYLIGNAN-4'OLE-6-ONE) ENANTIOMER**

SKRIPSI

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

**CECILIA CHERYL LIYADI
N111 16 044**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**ANALISIS KARAKTERISASI ENANTIOMER SENYAWA MMEO
(3-METOKSI-3, 4-(METILEN-DIOKSI)-2, 5-EPOKSILIGNAN-4OL-6-ON)**

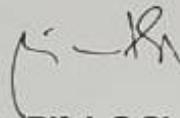
CECILIA CHERYL LIYADI

N111 16 044

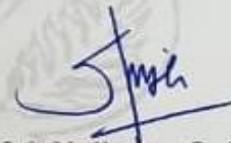
Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



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



**Dr. Risfah Yulianty, S. Si., M. Si., Apt.
NIP. 19780716 200312 2 001**

Pada tanggal : 27 November 2020

SKRIPSI

ANALISIS KARAKTERISASI ENANTIOMER SENYAWA MMEO (3-METOKSI-3, 4-(METILENDIOKSI)-2, 5-EPOKSILIGNAN-4OL-6-ON)

CHARACTERIZATION ANALYSIS OF MMEO (3-METHOXY-3, 4-(METHYLENEDIOXY)-2, 5-EPOXYLIGNAN-4OLE-6-ONE) ENANTIOMER

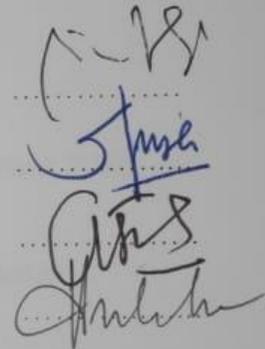
Disusun dan diajukan oleh :

CECILIA CHERYL LIYADI
N111 16 044

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 23 November 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

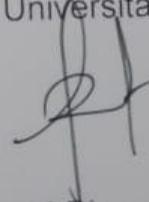
1. Ketua : Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.
2. Sekretaris : Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
3. Anggota : Muhammad Aswad, S.Si., M.Si, Ph.D., Apt.
4. Anggota : Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt.



Mengetahui,
Ketua Prodi S1 Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil 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 atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 29 November 2020



ng menyatakan,

Cecilia Cheryl Liyadi
N111 16 044

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala berkat, rahmat, dan pertolongan-Nya yang senantiasa diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian serta tugas akhir skripsi yang berjudul “Analisis Karakterisasi Enantiomer Senyawa MMEO (3-Metoksi-3, 4-(Metilendioksi)-2, 5-Epoksilignan-4ol-6-on)” yang telah selesai.

Untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini, dibutuhkan perjuangan yang panjang, dan tidak lepas dari bantuan banyak pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya, dengan penuh rasa hormat kepada:

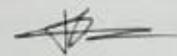
1. Para pembimbing, yaitu Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm. Ph.D., Apt. sebagai pembimbing utama dan Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang senantiasa meluangkan waktunya dalam memberikan masukan, bimbingan dan saran dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
2. Para penguji, yaitu Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si, Ph.D., Apt dan Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt. yang turut memberikan masukan dan saran kepada penulis.
3. Dekan, Wakil Dekan, dan para dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan, penelitian dan skripsi penulis.

Terhusus penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kepada kedua orang tua yang peneliti hormati, Bapak Alfred Andrian Liyadi dan Lily Tjankilisan dengan tulus memberi doa dan dukungan baik dalam doa maupun dalam bantuan berupa material di setiap langkah dalam menjalani perkuliahan, penelitian dan penyelesaian penyusunan skripsi penulis.
2. Kepada seluruh anggota NEOST16MINE KEMAFAR-UH, kak Jauhari dan kak Mukarram yang telah membantu dan menyemangati penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis menyadari masih ada beberapa kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dibutuhkan untuk kelengkapan penyusunan selanjutnya. Akhir kata dari penulis, semoga penelitian dan skripsi yang penulis lakukan bermanfaat untuk kita semua.

Makassar 27 November 2020



Cecilia Cheryl Liyadi

ABSTRAK

CECILIA CHERYL LIYADI. *Analisis Karakterisasi Enantiomer Senyawa MMEO (3'-Metoksi-3', 4'-(Metilendioksi)-2, 5-Epoksilignan-4'ol-6-on)*
(Dibimbing oleh Yusnita Rifai dan Risfah Yulianty)

MMEO (3'-metoksi-3', 4' (metilendioksi)-2, 5-epoksilignan-4'ol-6-on) merupakan suatu senyawa epoksilignan yang disintesis dari tanaman *Piper nigrum*. Senyawa ini memiliki aktivitas menghambat ekspresi mRNA dari *protein-patched homolog* (Ptch) pada sel kanker pankreas manusia dan mungkin dapat digunakan untuk penyakit yang berkaitan dengan tumor. Tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk mengetahui sifat dan karakteristik enantiomer dari senyawa MMEO. Enantiomer MMEO memiliki sifat fisik yang sama dengan MMEO, dan memiliki besar rotasi optik yang sama, tetapi dengan arah rotasi yang berbeda. Rotasi optik MMEO adalah +32,5148, sedangkan rotasi optik enantiomer MMEO adalah -32,5329. Enantiomer MMEO bertipe (-) karena memiliki arah rotasi optik yang berlawanan dengan arah jarum jam. Hasil karakterisasi menggunakan KLT menggunakan eluen heksan:etil asetat 4:1, diperoleh Rf berturut-turut sebanyak 0,93 dan 0,85 pada MMEO dan enantiomer MMEO, dan 0,22 pada enantiomer MMEO saja; sedangkan pada eluen heksan:etil asetat 3:5 memiliki nilai Rf berturut-turut 0,91 pada MMEO dan enantiomer MMEO; 0,57 pada MMEO, dan 0,84 pada enantiomer MMEO. Hasil karakterisasi menggunakan FT-IR diperoleh bahwa baik MMEO maupun enantiomernya memiliki gugus aromatik, eter dan alkohol. Sedangkan, hasil karakterisasi menggunakan ¹³C-NMR dan ¹H-NMR menunjukkan bahwa MMEO dan enantiomernya memiliki spektra yang serupa dan tidak menimbulkan perbedaan yang mencolok selain banyaknya peak multiplet yang muncul.

Kata Kunci : Enantiomerisasi, karakterisasi, MMEO, Polarimeter.

ABSTRACT

CECILIA CHERYL LIYADI. Characterization Analysis Of MMEO (3-Methoxy-3', 4''-(Methylenedioxy)-2, 5-Epoxy lignan-4'Ole-6-One) Enantiomer (Supervised by Yusnita Rifai and Risfah Yulianty)

MMEO (3-Methoxy-3', 4''-(Methylenedioxy)-2, 5-Epoxy lignan-4'Ole-6-One) is an epoxy lignan compound that is synthesized from black pepper (*Piper nigrum*). This compound has the activity of inhibiting mRNA expression from protein-patched homologues (Ptch) in human pancreatic cancer cells and may be used for tumor-related diseases. The purpose of this study was to determine the nature and characteristics of enantiomers from MMEO. The enantiomer of MMEO has the same physical properties as MMEO, and has the same value of optical rotation, but in different directions. MMEO's optical rotation is +32.5148, and the enantiomer has an optical rotation of -32.5329. The enantiomer of MMEO is (-) because its optical rotation rotates in an anticlockwise direction. The TLC results using the eluent hexane and ethyl acetate with a ratio of 4:1, have the R_f value of 0.93 and 0.85 for both MMEO and its enantiomer, and 0.22 for only the enantiomer of MMEO, respectively. While using the eluent of hexane and ethyl acetate with a ratio of 3:5, the results have the R_f value of 0.91 for both MMEO and its enantiomer, 0.57 for MMEO, and 0.84 for the enantiomer of MMEO, respectively. The characterization results using FT-IR show that both MMEO and its enantiomer have alcohol, ether, and aromatic functional groups. On the other hand, characterizations using ¹³C-NMR dan ¹H-NMR show that both MMEO and its enantiomer have spectra that look alike with each other, and doesn't have a major difference aside from the amount of the multiplet peaks.

Keywords : Enantiomerization, characterization, MMEO, Polarimeter

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. MMEO	4
II.2. Stereokimia	5
II.2.1 Enantiomer	6
II.3 Polarimeter dan Cahaya Terpolarisasi	11
II.4 Karakterisasi	13
II.4.1 Spektrofotometri UV-VIS	13
II.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	17

	Halaman
II.4.3 FT-IR	22
II.4.4 Spektroskopi NMR	29
BAB III METODE KERJA	34
III.1 Alat dan Bahan	33
III.2 Metode Penelitian	33
III.2.1 Enantiomerisasi MMEO	33
III.2.2 Karakterisasi Enantiomer MMEO	33
III.2.3 Analisis Data, Pembahasan, dan Penarikan Kesimpulan	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	59
SKEMA KERJA	56
PERHITUNGAN	57
DOKUMENTASI PENELITIAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Antagonisme pasangan enantiomer	9
2. Beberapa penjerap fase diam yang digunakan pada KLT	18
3. Tatanama lempeng KLT	19
4. Frekuensi gugus fungsi pada senyawa organik	28
5. Bilangan kuantum spin inti	29
6. Pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ MMEO	45
7. Pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ enantiomer MMEO	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur kimia MMEO	4
2. Radiasi polarisasi bidang	12
3. Instrumentasi spektrofotometer UV-Vis	15
4. Proses elusi pada KLT	21
5. Instrumentasi FT-IR dengan interferometer Michelson	25
6. Instrumentasi NMR	31
7. Hasil pengamatan MMEO dan enantiomernya menggunakan metode KLT	40
8. Hasil pengamatan MMEO menggunakan FT-IR	41
9. Hasil pengamatan enantiomer MMEO menggunakan FT-IR	42
10. Hasil pengamatan MMEO menggunakan H-NMR	44
11. Hasil pengamatan MMEO menggunakan C-NMR	44
12. Penomoran MMEO	45
13. Hasil pengamatan enantiomer MMEO menggunakan H-NMR	48
14. Hasil pengamatan enantiomer MMEO menggunakan C-NMR	48
15. Penomoran Enantiomer MMEO	49
16. Tabel pergeseran kimia H-NMR	59
17. Tabel pergeseran kimia C-NMR	59
18. Larutan stok MMEO sebanyak 500 ppm	60
19. Penimbangan enantiomer MMEO	60

Gambar	Halaman
20. Kurva baku spektrofotometri UV-Vis MMEO	60
21. Kurva spektrofotometri UV-Vis enantiomer MMEO	60
22. Hasil pengamatan MMEO (A) dan enantiomer MMEO (B) pada KLT dengan perbandingan heksan:etil asetat 4:1	60
23. Hasil pengamatan MMEO (A) dan enantiomer MMEO (B) pada KLT dengan perbandingan heksan:etil asetat 3:5	60

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

MMEO (3'-metoksi-3", 4"-(metilendioksi)-2, 5-epoksilignan-4'ol-6-on) merupakan suatu senyawa epoksilignan yang disintesis dari tanaman *Piper nigrum*. Senyawa ini memiliki aktivitas menghambat ekspresi mRNA dari *protein-patched homolog* (Ptch) pada sel kanker pankreas manusia dan mungkin dapat digunakan untuk penyakit yang berkaitan dengan tumor (Rifai *et al.*, 2016).

Isomer optik memiliki sifat fisik dan sifat kimia yang sama, tetapi perbedaannya terletak pada kemampuan untuk mempolarisasikan cahaya. Arah polarisasi cahaya senyawa dapat dipolarisasikan searah atau berlawanan jarum jam (Riswiyanto, 2009). Atom tetrahedral merupakan penyebab utama adanya kiralitas dalam molekul organik. Atom karbon dengan empat gugus fungsi berbeda yang terikat padanya tidak memiliki dua elemen simetri kunci dan disebut pusat kiral (Brown, 2018).

Enantiomer merupakan suatu isomer optis yang berupa gambar cermin yang tidak dapat ditumpangkan satu sama lain. Istilah kiral dan akiral merujuk ke objek, sedangkan istilah enantiomer mengacu pada hubungan antara sepasang objek (Brown, 2018). Isomer optik atau enantiomer memiliki sifat fisik dan kimia yang sama, seperti titik lebur, pKa, kelarutan, dan sebagainya. (Chhabra *et al.*, 2013).

Adanya respon biologis yang berbeda yang diinduksi oleh pasangan enantiomer dapat menyebabkan perbedaan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik (Wermuth, 2015). Perbedaan sifat farmakokinetik yang diakibatkan oleh stereoisomerisme antara lain dapat menyebabkan perbedaan laju absorpsi, bioavailabilitas, dan ikatan obat terhadap protein. Sedangkan, pengaruh stereoisomerisme terhadap sifat farmakodinamik antara lain terjadi perbedaan pada potensi dan aktivitas farmakologi. Adanya isomer dapat menyebabkan perbedaan kegunaan terapeutik dan interaksi obat (Chhabra *et al.*, 2013) .

Penggunaan obat dengan bentuk enantiomer tunggal berpotensi dapat menyebabkan profil farmakologis dan farmakokinetika yang lebih sederhana dan selektif, sertameningkatkan indeks terapeutik tingkat metabolisme yang berbeda dari berbagai enantiomer yang berbeda, serta penurunan interaksi obat. Misalnya, suatu enantiomer mungkin dapat memberikan efek terapi suatu obat sedangkan enantiomer lainnya tidak aktif dan/atau berkontribusi terhadap efek yang tidak diinginkan, sehingga penggunaan enantiomer tunggal akan memberikan obat yang unggul dan mungkin lebih disukai daripada bentuk rasemik obat (McConathy dan Owens, 2003). Formulasi enantiomer tunggal dari (S')-albuterol, sebuah agonis reseptor β_2 adrenergik yang digunakan dalam pengobatan asma, dan (S')-omeprazol, sebuah inhibitor pompa proton untuk mengobati GERD (*Gastro-Esophageal Reflux Disease*) telah dibuktikan lebih unggul dibandingkan dengan formulasi dalam bentuk rasemiknya jika diuji secara klinis (Flockhart dan Nelson, 2002).

Namun, dalam kasus lain, kedua enantiomer dari obat kiral dapat berkontribusi terhadap efek terapeutik, dan penggunaan enantiomer tunggal mungkin kurang efektif atau bahkan kurang aman daripada bentuk rasemik (McConathy dan Owens, 2003). Contohnya adalah enantiomer (-)-sotalol memiliki aktivitas β -bloker dan antiaritmik, sedangkan enantiomer (+)-sotalol memiliki efek antiaritmik, tetapi tidak memiliki efek antagonis β -adrenergik (Kato *et al.*, 1986; Advani dan Singh, 1995).

I.2. Rumusan Masalah

1. Jenis enantiomer apakah yang diperoleh dari MMEO?
2. Bagaimana karakteristik enantiomer MMEO yang telah diperoleh?

I.3. Tujuan Penulisan

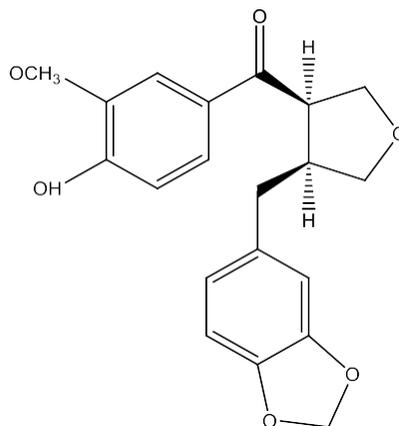
1. Untuk mengetahui jenis enantiomer MMEO.
2. Untuk mengetahui karakteristik enantiomer MMEO.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. MMEO

MMEO(3'-metoksi-3", 4"-(metilendioksi)-2, 5-epoksilignan-4'ol-6-on) merupakan suatu senyawa epoksilignan yang disintesis dari tanaman lada hitam(*Piper nigrum*). Senyawa ini dapat menghambat faktor transkripsi jalur *Hedgehog* (Hh) yang dinamakan Gli. Gli dapat terlibat dalam pembentukan kanker pankreas dan prostat jika diekspresikan secara berlebihan, dikarenakan oleh hubungan langsung Gli dengan situs pengikatan spesifik (50-GACCACCCA-3) di wilayah promotor gen target (Rifai *et al.*, 2016).



Gambar 1. Struktur kimia MMEO (Rifai *et al.*, 2016)

MMEO memiliki aktivitas penghambatan pensinyalan Hh dan menjadi sitotoksik selektif terhadap sel PANC1. Pada konsentrasi 4,1 μM , senyawa ini menurunkan regulasi tingkat protein inti Gli1 dalam *pancreatic cancer cell line* (PANC1) dengan menghalangi translokasi faktor transkripsi Gli ke dalam inti sel PANC1. Struktur ini unik karena kapasitas gugus metoksi yang melekat

pada C-6 antara cincin benzena dan lima cincin beranggotakan 5 atom karbon yang berputar secara bebas (Rifai *et al.*, 2016).

II.2. Stereokimia

Objek yang bayangan cerminnya tidak dapat dihindarkan satu sama lain disebut kiral (berasal dari bahasa Yunani *cheir* yang artinya tangan). Kiralitas hanya ditemukan pada semua jenis objek tiga dimensi, contohnya antara lain tangan kanan dan kiri, baling-baling kapal, dan jilid spiral pada buku catatan. Sedangkan, objek yang dapat dihindarkan satu sama lain dengan bayangan cerminnya disebut objek akiral. Contoh objek akiral antara lain cangkir yang tidak dihias, tetrahedron, kubus, dan sebuah bola sempurna (Brown, 2018). Sebuah objek maupun molekul dapat menjadi akiral apabila memiliki elemen simetri sebanyak satu atau lebih. Elemen simetri yang paling umum dijumpai pada senyawa organik antara lain sumbu dan pusat simetri. Objek atau molekul apapun yang memiliki elemen simetri bersifat akiral dan dapat ditumpang tindihkan di atas bayangan cerminnya (Brown, 2018).

Kiralitas dapat muncul dari kemampuan suatu molekul yang menjadi isomer konfigurasional. Penyebab kiralitas yang paling umum pada molekul organik adalah atom tetrahedral, yaitu atom (biasanya atom karbon) yang terikat dengan 4 gugus fungsi yang berbeda. Atom karbon yang terikat ke 4 gugus yang berbeda tidak memiliki komponen utama simetri, dan disebut pusat kiral. Istilah *stereocenter* juga digunakan untuk atom karbon yang terikat ke 4 gugus fungsi yang berbeda, tetapi dalam konteks yang lebih luas.

Stereocenter adalah atom tempat pertukaran dua gugus fungsi yang menghasilkan stereoisomer (Brown, 2018).

II.2.1. Enantiomer

Enantiomer merupakan isomer optik berupa bayangan cermin yang tidak dapat dihindarkan satu sama lain, yang mengacu pada hubungan pada sepasang objek. Isomer konfigurasi dapat memiliki bentuk sebagai objek kiral dan akiral. Ketika isomer kiral, mereka adalah enantiomer satu sama lain, sama seperti tangan kanan dan kiri adalah enantiomer (Brown, 2018). Pada molekul dengan jumlah atom C kiral lebih dari satu, pasangan enantiomernya harus memiliki konfigurasi yang berhadapan dengan tiap pusatnya (Carey & Sundberg, 2007).

Isomer optik atau enantiomer memiliki sifat fisik dan kimia yang sama, seperti titik lebur yang identik, pKa, kelarutan, dan sebagainya. Tetapi perbedaan keduanya adalah setiap enantiomer memutar arah cahaya yang terpolarisasi ke arah yang berbeda meskipun dengan derajat yang sama (Chhabra *et al.*, 2013). Rotasi spesifik (α) yang diperoleh adalah konstanta yang hanya dapat diperoleh molekul kiral. Terkadang, ada senyawa yang memiliki kandungan enantiomer (+) dan (-) dengan perbandingan 1:1, sehingga tidak memutar cahaya terpolarisasi dan bersifat optis inaktif. Campuran tersebut disebut campuran rasemik. Interkonversi enantiomer dapat mengarah ke rasemisasi dan hilangnya aktivitas optik (Vollhardt & Schore, 2014).

Dalam obat-obatan, stereoisomer mengakibatkan perbedaan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik. Perbedaan sifat farmakokinetik yang diakibatkan oleh stereoisomerisme antara lain dapat menyebabkan perbedaan laju absorpsi, bioavailabilitas, dan ikatan obat terhadap protein. Sedangkan, pengaruh stereoisomerisme terhadap sifat farmakodinamik antara lain terjadi perbedaan pada potensi dan aktivitas farmakologi. Adanya isomer dapat menyebabkan perbedaan kegunaan terapeutik dan interaksi obat (Chhabra *et al.*, 2013).

Penggunaan obat dengan bentuk enantiomer tunggal berpotensi dapat menyebabkan profil farmakologis dan farmakokinetika yang lebih sederhana dan selektif, serta meningkatkan indeks terapeutik tingkat metabolisme yang berbeda dari berbagai enantiomer yang berbeda, serta penurunan interaksi obat. Misalnya, suatu enantiomer mungkin dapat memberikan efek terapi suatu obat sedangkan enantiomer lainnya tidak aktif dan/atau berkontribusi terhadap efek yang tidak diinginkan, sehingga penggunaan enantiomer tunggal akan memberikan obat yang unggul dan mungkin lebih disukai daripada bentuk rasemik obat (McConathy dan Owens, 2003). Formulasi enantiomer tunggal dari (S')-albuterol, sebuah agonis reseptor β_2 adrenergik yang digunakan dalam pengobatan asma, dan (S')-omeprazol, sebuah inhibitor pompa proton untuk mengobati GERD (*Gastro-Esophageal Reflux Disease*) telah dibuktikan lebih unggul dibandingkan dengan formulasi dalam bentuk rasemiknya jika diuji secara klinis (Flockhart dan Nelson, 2002).

Namun, dalam kasus lain, kedua enantiomer dari obat kiral dapat berkontribusi terhadap efek terapeutik, dan penggunaan enantiomer tunggal mungkin kurang efektif atau bahkan kurang aman daripada bentuk rasemik (McConathy dan Owens, 2003). Contohnya adalah enantiomer (-)-sotalol memiliki aktivitas β -bloker dan antiaritmik, sedangkan enantiomer (+)-sotalol memiliki efek antiaritmik, tetapi tidak memiliki efek antagonis β -adrenergik (Kato *et al.*, 1986; Advani dan Singh, 1995).

Terhadap suatu target biologis, potensi dua enantiomer kadang-kadang dapat sangat berbeda dan kadang-kadang sangat mirip. Seringkali aktivitas terfokuskan hanya dalam satu enantiomer. Ketika stereoselektivitas tinggi muncul, diakui bahwa mekanisme aksi pada tingkat molekuler melibatkan interaksi yang sangat spesifik antara ligan, molekul kiral, dan tempat pengenalan, yaitu lingkungan kiral. Diharapkan bahwa isomer yang paling aktif, dalam hal afinitas, mencapai komplementaritas sterik yang lebih baik untuk reseptor daripada yang kurang aktif (Wermuth, 2015).

Tabel 1. Antagonisme pasangan enantiomer (Wermuth, 2015)

Senyawa	Eutomer	Distomer	Rasemat
N-isopropil-norepinefrin	(-) agonis α -adrenergik	(+) antagonis kompetitif inaktif	(\pm) agonis parsial
5-etil-5(1,3-dimetilbutil)asam barbiturat	(+) konvulsan	(-) depresan	(\pm) konvulsan
Ozolinon (Metabolit etazolin)	(-) diuretik	(+) menghambat dosis rendah dari enantiomer (-) atau furosemid	(\pm) diuretik
Picnadol	(+) morfinomimetik	(-) antagonis narkotik	(\pm) Agonis parsial
Asam alfa-(2, 4, 5)-trikloro-fenoksi-propionat	(+)regulator pertumbuhan tanaman yang menyerupai auksin	(-) mengurangi aktivitas enantiomer (+)	(\pm)regulator pertumbuhan tanaman yang menyerupai auksin
6-etil-9-oksaergolin (EOE)	(-)agonis dopamin	(+) antagonis dopamin	(\pm) agonis dopamin

Sumber: Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, Pierre and Ragnan, Didier (editors). (2015). *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier, USA. p. 440

Di samping perbedaan potensi obat, sering terjadi perbedaan profil farmakologis dari 2 enantiomer. Memisahkan campuran rasemik dapat menghasilkan 2 senyawa yang berbeda secara farmakologis, dan dapat memisahkan senyawa yang lebih aktif dari isomer yang lebih bersifat toksik. Pada pasangan kuinin-kuinidin, kedua isomer memiliki aktivitas antimalaria, antipiretik, dan oksitoksik, serta aktivitas depresan pada otot rangka dan otot jantung. Tetapi, pengobatan demam dan malaria merupakan penggunaan utama kuinin, sedangkan kuinidin lebih efektif pada otot jantung dan digunakan dalam terapi fibrilasi atrium dan aritmia tertentu lainnya (Wermuth, 2015).

Banyak obat yang struktur kimianya memiliki pusat asimetri masih digunakan dalam praktik klinis sebagai rasemat. Campuran rasemik diperkirakan mewakili 10-15 persen dari semua obat yang dipasarkan. Untuk jenis terapi tertentu, seperti agen β -adrenergik, β -adrenergik, antiepilepsi, dan

antikoagulan oral, hingga 90 persen dari senyawa tersebut sebenarnya merupakan campuran rasemik menurut Ariens. Untuk antihistamin dan anestesi lokal, ini berlaku untuk sekitar 50 persen obat yang saat ini digunakan. Seringkali, obat rasemat diperkenalkan dalam praktik klinis karena farmakologi hewan dan klinis, toksikologi, dan teratologi dilakukan dengan rasemat. Alasannya adalah pada saat penemuan obat, resolusi (atau sintesis kiral) tampaknya terlalu sulit, terlalu mahal, atau bahkan tidak mungkin (Wermuth, 2015).

Biasanya, tren umum di industri farmasi adalah menukar sediaan obat rasemik menjadi enantiomer tunggal. Contoh diberikan oleh (R)-(2)-verapamil, (S)-fluoxetine, (S)-ketoprofen, (R)-albuterol, levofloxacin, esoprazole, cetirizine, cetirizine, cisapride, dan banyak lainnya. Selain peningkatan kualitas obat, pertukaran ini merupakan cara untuk memperpanjang hidup obat sepanjang eutomer yang terisolasi secara hukum dianggap sebagai entitas obat baru. Sebagai akibatnya, perusahaan obat semakin mengadopsi pertukaran rasemat sebagai strategi manajemen. Perusahaan pertama kali mengembangkan obat kiral sebagai rasemat, dan kemudian mematenkan dan mengembangkan isomer tunggal. Namun, strategi ini tidak selalu berhasil. Ini diilustrasikan oleh S (2)-Eutomer propranolol. Senyawa ini menunjukkan aktivitas β -bloker yang berkurang ketika diberikan sebagai isomer tunggal, dibandingkan dengan sediaan rasemat, menunjukkan bahwa keberadaan R (1)-propranolol memiliki efek menguntungkan pada bioavailabilitas S (2) – propranolol (Wermuth, 2015).

II.3. Polarimeter dan Cahaya Terpolarisasi

Berbagai struktur tidak simetris dapat memutar bidang polarisasi radiasi dalam suatu derajat tertentu. Struktur tersebut dikenal sebagai zat optis aktif. Pemutaran bidang polarisasi dapat berupa *dextro-rotary* (+) bila arahnya searah dengan jarum jam, ataupun *levo-rotary* (-) bila arahnya berlawanan dengan arah jarum jam. Derajat rotasi bergantung pada berbagai parameter, seperti jumlah molekul pada lintasan radiasi, konsentrasi, panjang pipa polarimeter, panjang gelombang radiasi, dan temperatur (Khopkar, 1990).

Rotasi spesifik digambarkan dengan rumus berikut.

$$[\alpha]_t = \frac{\alpha}{dc}$$

Keterangan:

α : sudut pada bidang cahaya terpolarisasi yang dirotasi pada suatu larutan dengan konsentrasi c

d : panjang bejana (dm)

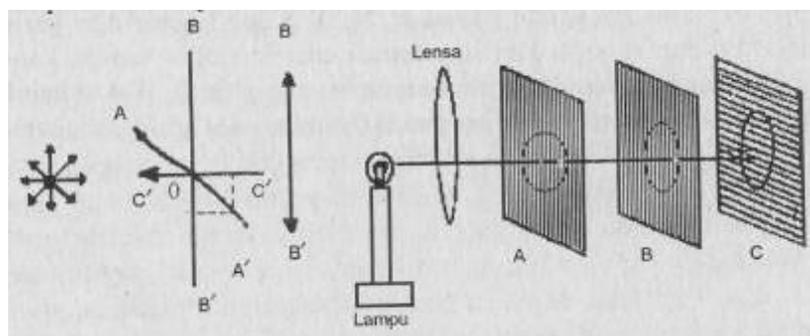
c : konsentrasi larutan (g zat terlarut/mL larutan)

Polarimeter adalah alat untuk mengukur besarnya putaran berkas cahaya terpolarisasi oleh suatu zat yang bersifat optis aktif. Besarnya ditentukan dengan memutar *analyzer* sedemikian rupa pada saat tabung terisi sampel, sehingga posisi cahaya yang diamati secara visual dapat kembali pada posisinya, bila tabung tidak berisi sampel (Khopkar, 1990).

Suatu radiasi monokromatik dari lampu natrium dibuat paralel dengan suatu kolimator, lalu dipolarisasikan menggunakan prisma kalsit. Dengan menggunakan prisma nikol, separuh berkas cahaya hasil polarisasi tampil sebagai suatu bayangan gelap. Berkas cahaya yang separuh lagi kemudian

melintas melalui jendela pelindung, setelah itu sampel melalui *analyser* nikol untuk sampai ke mata pengamat (Khopkar, 1990).

Pada saat cahaya yang tegak lurus melewati polariser, berkas cahaya (AOA') akan terresolusi menjadi BOB' dan COC' (Gambar 2). Berkas cahaya COC' dieliminasi oleh prisma nikol, sedangkan BOB' diteruskan. Cahaya yang diteruskan merupakan cahaya terpolarisasi bidang. Jika pada lintasan berkas cahaya terpolarisasi (BOB') diletakkan 2 buah polarida A dan B yang memiliki polarisasi yang sama dengan BOB', berkas cahaya akan lewat tanpa terintangi. Tetapi jika polarida yang digunakan adalah polarida dengan bidang polarisasi yang tegak lurus terhadap BOB', maka cahaya tidak dapat lewat. Bila bidang polarida tersebut memiliki sudut yang lebih kecil dari 90° , maka sebagian dari berkas cahaya (BOB') akan diteruskan (Khopkar, 1990).



Gambar 2. Radiasi terpolarisasi bidang (Khopkar, 1990).

Sehingga, dapat dikatakan bahwa suatu berkas radiasi dapat terpolarisasi dari tingkat nol (memiliki simetri sempurna dengan polarida yang digunakan), sampai dengan tingkat 100% (polarida yang digunakan tegak lurus terhadap bekas radiasi yang terpolarisasi). Polarida yang berupa kristal, larutan, dan cairan yang dapat memutar cahaya terpolarisasi dikenal sebagai

zat yang bersifat optis aktif. Besar putaran atau rotasi zat tersebut terhadap panjang gelombang dikenal sebagai dispersi rotasi optis (Khopkar, 1990).

II.4. Karakterisasi

II.4.1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Kelebihan spektrofotometer dibandingkan dengan fotometer adalah panjang gelombang yang dihasilkan dari cahaya putih lebih terseleksi menggunakan alat pengurai seperti prisma, *grating*, atau celah optis. Suatu spektrofotometer terdiri dari sumber spektrum tampak yang kontinu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko, dan alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel, blangko, ataupun pembanding (Khopkar, 1990).

A. Prinsip Kerja

Pada penyerapan sinar UV dan sinar tampak pada molekul organik, dikenal 2 macam istilah, yaitu kromofor dan auksokrom. Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam suatu senyawa organik yang dapat menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak, sedangkan auksokrom adalah gugus fungsi yang memiliki elektron bebas, seperti $-\text{OH}$, $-\text{O}$, $-\text{NH}_2$, dan $-\text{OCH}_3$ (Gandjar, 2007).

Spektrum UV-Vis ditabelkan dalam bentuk dua dimensi, dengan sumbu x merupakan panjang gelombang dan sumbu y menggambarkan absorbansi

(serapan). Spektrum ini pada umumnya berbentuk pita lebar. Semakin banyak sinar diabsorpsi oleh sampel organik pada panjang gelombang tertentu, semakin tinggi absorban. Pernyataan ini dinyatakan dalam hukum Lambert-Beer yang digambarkan dengan rumus berikut:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot c = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan:

A = absorban

a = absorptivitas (g⁻¹ cm⁻¹)

b = lebar sel yang dilalui sinar (cm)

c = konsentrasi (mol/L)

ε = ekstinsi (absorptivitas) molar (M⁻¹cm⁻¹)

I₀ = intensitas sinar sebelum melalui sampel

I = intensitas sinar setelah melalui sampel

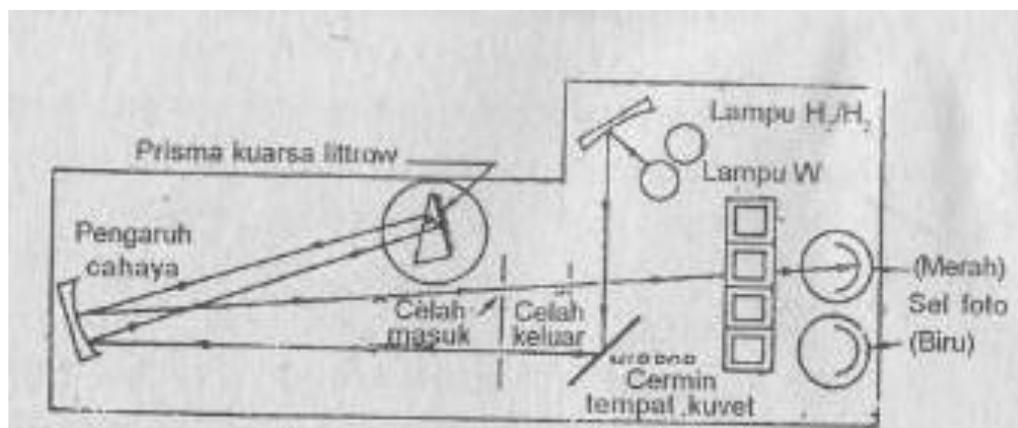
Perbandingan logaritma I₀ dan I menyatakan seberapa besar sinar tersebut diabsorpsi oleh sampel. Nilai ekstinsi molar (ε) dapat dihitung berdasarkan spektrum UV-Vis menggunakan persamaan Lambert-Beer. Nilai ε penting dalam penentuan struktur, karena terkait dengan transisi elektron yang dibolehkan atau transisi yang tidak diperbolehkan, sehingga akan dapat diperkirakan kromofor dari senyawa yang dianalisis. Dengan menggunakan persamaan Lambert-Beer, konsentrasi suatu senyawa dalam suatu pelarut dapat dihitung (Suhartati, 2017).

Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk melakukan analisis secara kualitatif maupun kuantitatif. Pada analisis kualitatif, data hasil spektrofotometri UV-Vis harus digabung dengan cara lain seperti FT-IR, NMR,

dan spektroskopi massa. Data yang diperoleh dari spektrofotometri UV-Vis kemudian dibandingkan dengan *published data* (data yang dipublikasikan). Sedangkan, pada analisis kuantitatif, suatu berkas radiasi mengenai larutan sampel, dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur. Radiasi yang diserap sampel ditentukan dengan intensitas sinar yang diteruskan dengan intensitas sinar yang diserap (Gandjar, 2007)

B. Instrumentasi Spektrofotometer UV-Vis

Secara garis besar, alat spektrofotometer UV-Vis terdiri dari beberapa komponen sebagai berikut (Khopkar, 1990):



Gambar 3. Instrumentasi spektrofotometer UV-Vis(Khopkar, 1990).

a. Sumber Cahaya

Sumber cahaya yang umumnya digunakan pada spektroskopi absorpsi adalah lampu wolfram. Selain itu, lampu hidrogen atau lampu deuterium juga digunakan untuk sumber pada daerah UV. Keunggulan dari penggunaan lampu wolfram adalah energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang (Khopkar, 1990).

b. Monokromator

Monokromator adalah alat yang digunakan untuk memperoleh sumber berupa sinar yang bersifat monokromatis. Pada umumnya, monokromator dapat berupa prisma ataupun grating. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian, dapat digunakan celah. Jika posisi celah tetap, prisma atau gratingnya perlu diatur sedemikian rupa dengan cara rotasi, agar mendapatkan panjang gelombang yang diinginkan (Khopkar, 1990).

c. Sel Absorpsi

Pada pengukuran di daerah sinar tampak, biasanya digunakan kuvet kaca atau kuvet kaca corex, tetapi pada pengukuran pada daerah UV, sel kuarsa perlu digunakan karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Pada umumnya, tebal kuvet yang digunakan berukuran 10 mm, tetapi yang lebih kecil ataupun yang lebih besar dapat juga digunakan. Sel yang biasanya digunakan berbentuk persegi, tetapi bentuk silinder juga dapat digunakan, Untuk pelarut organik, kuvet yang digunakan harus kuvet yang bertutup (Khopkar, 1990).

d. Detektor

Detektor penerima berperan sebagai pemberi respons terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang (Khopkar, 1990).

II.4.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. Metode ini merupakan salah satu bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada metode ini, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang (eluen) lalu bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan menaik (*ascending*) atau pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar, 2007).

KLT dalam pelaksanaannya lebih murah dan lebih mudah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Peralatan yang digunakan pada metode ini lebih sederhana dan dapat dilakukan dengan cepat. Selain itu, terdapat beberapa keuntungan lainnya saat menggunakan KLT, seperti (Gandjar, 2007):

1. Dapat digunakan untuk tujuan analisis
2. Dapat dilakukan identifikasi pemisahan komponen dengan menggunakan pereaksi warna, fluoresensi, atau radiasi menggunakan sinar UV.
3. Dapat digunakan berbagai variasi elusi, seperti elusi secara menaik, menurun, atau dua dimensi.
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan kadarnya merupakan bercak yang tidak bergerak.

A. Fase Diam KLT

Fase diam yang biasanya digunakan pada KLT merupakan penjerap berukuran kecil yang memiliki diameter partikel berukuran antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka kinerja KLT yang dilakukan semakin baik dalam hal efisiensi dan resolusi. Kebanyakan penjerap dikontrol keajegan ukuran partikel dan luas permukaannya. Penjerap yang biasanya digunakan dalam fase diam KLT memiliki mekanisme sorpsi dan fungsi yang bervariasi sesuai dengan zat yang akan dianalisis, seperti yang diperlihatkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Beberapa penjerap fase diam yang digunakan pada KLT

Penjerap	Mekanisme sorpsi	Penggunaan
Silika gel	Adsorpsi	Asam amino, hidrokarbon, vitamin, alkaloid.
Silika yang dimodifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi	Senyawa nonpolar
Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat
Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, ion logam, pewarna makanan, alkaloid
Kieselguhr (tanah Diatomae)	Partisi	Gula, asam-asam lemak
Selulosa penukar ion	Pertukaran ion	Asam nukleat, nukleotida, halida, dan ion-ion logam
Gel sephadex	Eksklusi	Polimer, protein, kompleks logam
β -siklodekstrin	Interaksi adsorpsi stereospesifik	Campuran enantiomer

Sumber: Kealey, D and Haines, P.J. (2002). *Instant Notes: Analytical Chemistry*. BIOS Scientific Publishers Limited. New York

Lempeng KLT disiapkan dengan melapiskan penjerap ke permukaan lapisan kaca, gelas, atau aluminium dengan ketebalan 250 μm . Lempeng ini telah beredar di pasaran dengan berbagai ukuran dan telah ditambah dengan reagen fluoresen untuk melihat adanya deteksi bercak solut. Selain itu,

lempeng KLT pada umumnya sudah ditambahkan dengan agen pengikat, misalnya kalsium sulfat (Gandjar, 2007).

Lempeng KLT yang tersedia di pasaran biasanya menggunakan simbol-simbol tertentu. Penamaan (nomenklatur) lempeng pada KLT diringkas pada tabel 3 (Gandjar, 2007).

Tabel 3. Tatanama lempeng KLT

Simbol/Singkatan	Arti
"Sil"	Suatu produk yang mengandung silika gel, seperti Anasil yang diproduksi dari pabrik Analabs
G	Pengikat gipsum ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$)
S	Pengikat <i>starch</i> (pati)
O	Pengikat organik, seperti polimetakrilat/polikarboksilat. Lapisan ini bersifat keras dan tahann terhadap abrasi.
H atau N	" <i>No foreign binder</i> " (Tidak ada pengikat luar). Produk dengan kode ini juga dapat mengandung berbagai macam penjerap yang berbeda, seperti silika gel hidrat atau asam silikat koloidal untuk meningkatkan stabilitas lapisan.
HL	<i>Hard layer</i> (Lapisan keras), merupakan lapisan yang tahan terhadap abrasi dan mengandung penjerap anorganik
HR	" <i>Highly refined</i> "
P	Lapisan untuk preparatif
P + CaSO_4	Lapisan preparatif yang mengandung pengikat berupa kalsium sulfat
F atau UV	Memiliki bahan yang berfluoresensi seperti seng silikat teraktivasi mangan
254 dan 366	Digunakan setelah simbol F atau UV, untuk menunjukkan panjang gelombang eksitasi senyawa berfosforisensi yang ditambahkan
60	Silika gel (dari E. Merck) yang mempunyai ukuran pori 60 \AA^0 ($10 \text{ \AA}^0 = 1 \text{ nm}$). Ukuran pori yang lain ditandai 40, 80, dan 100.
D	Lempeng dibagi ke dalam serangkaian saluran (<i>channel</i>) yang paralel
K	Simbol yang digunakan oleh semua produk Whatman
RP	" <i>Reversed phase</i> "; RP_{18} atau RP-C_{18} menunjukkan bahwa gugus oktadesil silikon diikatkan secara kimia ke dalam silika gel
4, 7, 9	Bilangan yang dicantumkan setelah nama penjerap dan menunjukkan pH bubur penjerap

Sumber: Adamovics, J.A. (1997). *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals 2nd edition*. Marcel Dekker. New York.

B. Fase Gerak KLT

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering digunakan cara mencoba-coba, karena waktu yang diperlukan hanya

sebentar. Sistem eluen yang paling sederhana adalah campuran 2 pelarut organik, karena daya campuran kedua pelarut ini dapat diatur sedemikian rupa, sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Gandjar, 2007).

Ada beberapa kriteria eluen yang harus diperhatikan dalam memilih eluen yang sesuai untuk KLT, antara lain (Gandjar, 2007):

1. Eluen harus memiliki kemurnian yang sangat tinggi, karena KLT merupakan metode yang sensitif.
2. Daya elusi eluen harus diatur sedemikian rupa, sehingga nilai R_f yang diperoleh terletak antara 0,2-0,8 dan hasil pemisahan optimal.
3. Untuk pemisahan menggunakan fase diam yang bersifat polar seperti silika gel, polaritas eluen akan menentukan kecepatan migrasi solut yang juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar ke dalam pelarut non polar dapat meningkatkan nilai R_f secara signifikan.
4. Solut-solut yang bersifat polar ataupun ionik lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase gerak, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia berturut-turut akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

C. Penotolan Sampel

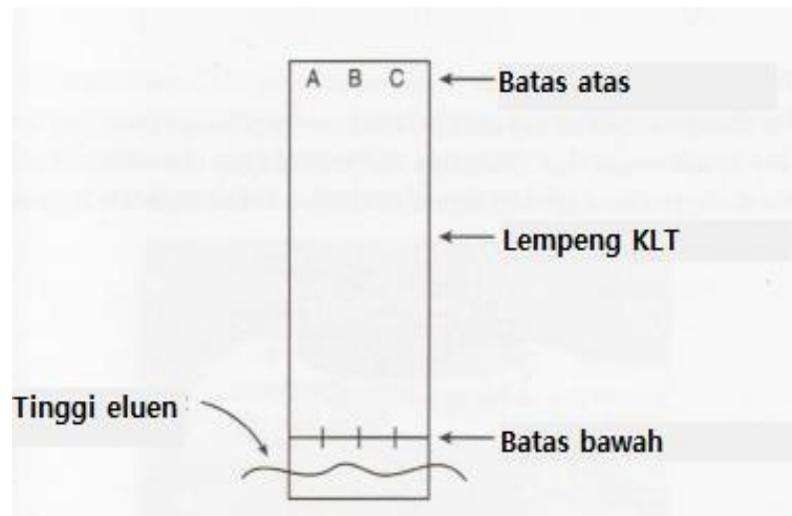
Pemisahan pada KLT dapat berlangsung secara optimal jika sampel ditotolkan pada lempeng dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Hal ini perlu diperhatikan, karena jika digunakan sampel yang terlalu banyak, maka akan menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat

akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar, 2007).

D. Pengembangan Sampel

Ketika sampel telah ditotolkan, tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut di dalam sebuah bejana (*chamber*) kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi oleh uap eluen yang digunakan. Tepi bagian bawah dari lempeng KLT yang telah ditotoli sampel kemudian dicelupkan ke dalam eluen, kurang lebih 0,5-1 cm, dan tinggi eluen yang digunakan harus di bawah lempeng yang telah ditotolkan sebelumnya (Gandjar, 2007).

Bejana (*chamber*) KLT yang digunakan harus tertutup rapat dan berisi volume eluen yang mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian yang telah ditentukan. Untuk memastikan apakah eluen jenuh atau tidak, biasanya digunakan kertas saring. Jika eluen telah mencapai ujung atas kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa eluen telah jenuh. Selama proses elusi, bejana kromatografi harus ditutup (Gandjar, 2007).



Gambar 4. Proses elusi pada KLT (Rummel and Beiswenger, 2016).

E. Deteksi Bercak

Bercak yang diperoleh pada KLT umumnya tidak berwarna. Untuk mendeteksi adanya bercak ini, dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologis. Pada metode kimia, umumnya bercak yang terbentuk direaksikan dengan pereaksi tertentu dengan cara penyemprotan, sehingga bercak menjadi lebih jelas. Beberapa metode fisika yang dapat digunakan untuk memperlihatkan bercak KLT antara lain dengan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar UV (Gandjar, 2007).

II.4.3. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR)

A. Sinar Inframerah

Daerah radiasi spektroskopi infra merah atau *infrared spectroscopy* (IR) berkisar pada bilangan gelombang $12800\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, atau panjang gelombang sebanyak $0,78\text{ - }1000\text{ }\mu\text{m}$. Daerah radiasi IR dibagi menjadi 3, yaitu daerah IR dekat (bilangan gelombang $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, panjang gelombang $0,78\text{-}2,5\text{ }\mu\text{m}$), IR tengah (bilangan gelombang $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$, panjang gelombang $2,5\text{-}$

50 μm), dan IR jauh (bilangan gelombang 200-10 cm^{-1} , panjang gelombang 50-1000 μm). Daerah yang paling umum digunakan dalam spektroskopi IR adalah daerah IR tengah dengan bilangan gelombang 4000-690 cm^{-1} (Khopkar, 1990).

Spektroskopi IR digunakan untuk penentuan struktur, terutama pada senyawa organik, dan untuk analisis kuantitatif. Spektrum infra merah memberikan puncak maksimal yang jelas sebaik puncak minimumnya. Spektrum absorpsi dibuat dengan bilangan gelombang pada sumbu X, dan persentase transmittan (T) pada sumbu Y. Bila dibandingkan dengan UV-Vis, di mana energi dalam daerah ini diperlukan untuk transisi elektron, maka radiasi infra merah bersifat terbatas pada perubahan energi setingkat molekul (Khopkar, 1990).

B. Vibrasi Molekul

Posisi relatif atom dalam suatu molekul berubah secara terus-menerus karena adanya vibrasi. Untuk molekul yang memiliki 2 atau 3 atom, vibrasinya dapat dianggap dan dihubungkan dengan energi absorpsi. Sedangkan, pada molekul poliatomik, vibrasi tidak dapat diprediksi dengan mudah, karena banyaknya pusat vibrasi yang berinteraksi (Khopkar, 1990).

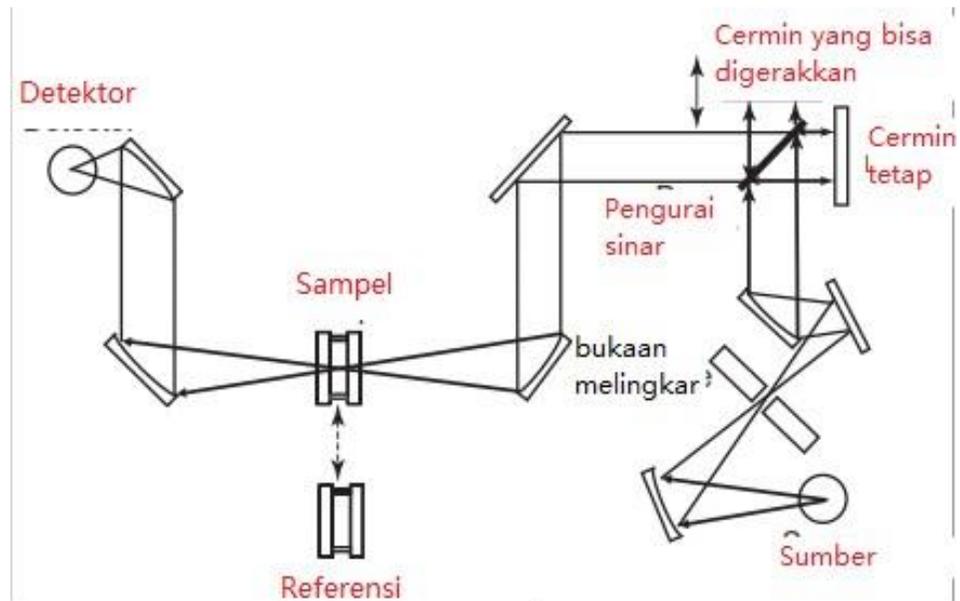
Vibrasi molekul dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu vibrasi ulur dan vibrasi tekuk. Vibrasi ulur menyangkut konstanta vibrasi antara 2 atom sepanjang sumbu ikatan, sedangkan vibrasi tekuk disebabkan oleh berubahnya sudut antara dua ikatan. Vibrasi tekuk dibagi lagi menjadi 4 tipe, yaitu *scissoring*, *twisting*, *wagging*, dan *rocking*. Keempat vibrasi ini hanya

mungkin terjadi pada molekul yang mempunyai lebih dari dua atom (Khopkar, 1990).

C. Instrumentasi FT-IR

Spektrofotometer FT-IR tidak bisa dibuat sebagai instrumen *double-beam*. Tidak seperti instrumen dispersif, spektrometer FT-IR memperoleh spektrum sumber tunggal sampel dan referensi, rasio mereka dihitung setelahnya. Sampel dan referensi dapat secara otomatis digantikan oleh slider sampel, atau sinar IR dapat dialihkan antara sampel dan referensi dengan cermin pada layar. Dalam hal angka akumulasi lebih tinggi, instrumen berganti-ganti antara sampel dan *scanning* referensi (Gauglitz dan Moore, 2014).

Jantung dari setiap spektrometer FT-IR adalah interferometer. Interferometer Michelson pada dasarnya terdiri dari pemecah cahaya dan dua cermin rata. Salah satu cermin dipasang dalam satu lengan interferometer, dan cermin lainnya bergerak di lengan interferometer kedua. *Beamsplitter* MIR yang paling umum dibuat dari KBr dengan lapisan multilayer. *Beamsplitter* harus memiliki reflektivitas 50% dan tidak ada daya serap pada rentang penggunaannya (Gauglitz dan Moore, 2014).



Gambar 5. Instrumentasi FT-IR dengan interferometer Michelson (Gauglitz dan Moore, 2014).

Pengoperasian interferometer Michelson didasarkan pada sinar IR yang terkolimasi. Yang terakhir diarahkan ke *beamsplitter*, yang membagi sinar menjadi dua bagian dengan intensitas yang sama (dalam kasus ideal). Sinar yang terbagi dipantulkan oleh cermin tetap dan bergerak kembali ke *beamsplitter*, di mana mereka bergabung kembali dan mengganggu. Perpindahan cermin yang dapat bergerak menyebabkan perubahan panjang jalur optik antara kedua sinar, sehingga kondisi untuk interferensi konstruktif dan destruktif serta semua kondisi antara keduanya bertemu secara berurutan. Sinar IR rekombinasi melewati sampel (atau referensi) dan mencapai detektor. Posisi dan pergerakan cermin bergerak dikendalikan oleh laser helium-neon ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). Interferogram laser helium-neon digunakan untuk mengontrol pengambilan sampel interferogram IR secara bertahap hingga $\lambda_{\text{HeNe}} / 2 = 316,4 \text{ nm}$ (Gauglitz dan Moore, 2014).

Adapun keuntungan dari metode spektroskopi FT-IR antara lain sebagai berikut (Gauglitz dan Moore, 2014):

1. Sampel tidak mendapatkan perlakuan/pemisahan khusus;
2. Metode analisisnya tidak memerlukan reagen;
3. Dapat mengukur sampel dalam wujud padat, cair maupun gas;
4. Waktu yang diperlukan relatif cepat;
5. Bersifat noninvasif;
6. Dapat mengukur sampel secara makro maupun mikro.

Di sisi lain, pengukuran dengan metode FT-IR secara inheren dihadapkan dengan masalah kompleksitas sampel dan sifat-sifat radiasi infra merah (Gauglitz dan Moore, 2014):

1. Penetrabilitas rendah dari radiasi inframerah, yang ditentukan oleh kuatnya absorpsi radiasi inframerah oleh air dan komponen lainnya;
2. Heterogenitas medium yang diukur, berpengaruh terhadap kuatnya penghamburan radiasi inframerah;
3. Variabilitas spasial (pengaturan elemen seluler yang tidak homogen) dan temporal (penuaan) dari biomaterial;
4. Kompleksitas spektrum yang diukur. Pita serapan komponen individu, biasanya dari sifat makromolekul, sangat tumpang tindih. Fakta ini dalam kebanyakan kasus mengecualikan kesimpulan kuantitatif atau bahkan kualitatif tanpa adanya proses komputasi luas dari data spektral.

D. Frekuensi Gugus Fungsi

Bilangan gelombang atau frekuensi perkiraan dari suatu gugus fungsi organik seperti C=O, C=C, C-H, C≡C, atau O-H dapat menyerap radiasi inframerah. Frekuensi ini disebut frekuensi gugus fungsi, jarang berbeda karena interaksi dengan getaran lain yang terkait dengan satu atau kedua atom yang menyusun gugus fungsi. Di sisi lain, efek interaksi seperti itu biasanya kecil; sebagai hasilnya, rentang frekuensi dapat ditetapkan di mana sangat mungkin bahwa absorpsi maksimum untuk gugus fungsi spesifik akan ditemukan (Skoog *et al.*, 2018).

Adapun tabel 4 menunjukkan frekuensi gugus fungsi pada senyawa organik (Skoog *et al.*, 2018).

Tabel 4. Frekuensi gugus fungsi pada senyawa organik

Ikatan	Tipe senyawa	Rentang frekuensi (cm ⁻¹)	Intensitas
C-H	Alkana	2850-2970	Kuat
		1340-1470	Kuat
C-H	Alkena (>C=C< ^H)	3010-3095	Sedang
		675-995	Kuat
C-H	Alkuna (-C≡C-H)	3300	Kuat
C-H	Cincin aromatik	3010-3100	Sedang
		690-900	Kuat
O-H	Alkohol monomer, fenol	3590-3650	Dapat berubah
	Alkohol terikat hidrogen, fenol	3200-3600	Dapat berubah, terkadang lebar
	Asam karboksilat monomerik	3500-3650	Sedang
	Asam karboksilat terikat hidrogen	2500-2700	Lebar
N-H	Amina, Amida	3300-3500	Sedang
C=C	Alkena	1610-1680	Dapat berubah
C=C	Cincin Aromatik	1500-1600	Dapat berubah
C≡C	Alkuna	2100-2260	Dapat berubah
C-N	Amina, amida	1180-1360	Kuat
C≡N	Nitril	2210-2280	Kuat
C-O	Alkohol, eter, asam	1050-1300	Kuat
	karboksilat, ester		
C=O	Aldehid, keton, asam	1690-1760	Kuat
	karboksilat, ester		
NO ₂	Senyawa nitro	1500-1570	Kuat
		1300-1370	Kuat

Sumber: Skoog, Douglas A., Holler, James F., and Crouch, Stanley R. (2018). *Principles of Instrumental Analysis Seventh Edition*. Cengage Learning, Boston. p. 418

Perbedaan kecil pada struktur dan konstitusi molekul menghasilkan perubahan signifikan pada distribusi absorpsi maksimum di wilayah spektrum antara 1200-600 cm⁻¹ (8-14 μm). Wilayah *fingerprints* dapat digunakan untuk mengidentifikasi komponen berdasarkan perbandingan spektra. Sebagian besar ikatan tunggal menimbulkan pita serapan pada frekuensi ini; karena energinya hampir sama, interaksi yang kuat terjadi antara ikatan lain di dekatnya. Pita absorpsi merupakan komposit dari berbagai interaksi ini dan bergantung pada keseluruhan struktur kerangka molekul. Interpretasi spektra yang tepat di wilayah ini jarang dimungkinkan karena kerumitan spektra. Namun, untuk tujuan identifikasi, kekayaan fitur spektral adalah keuntungan

tersendiri. Banyak senyawa menunjukkan absorpsi yang unik di wilayah ini, yang berguna untuk identifikasi akhir (Skoog *et al.*, 2018).

II.4.4. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (NMR)

A. Prinsip Dasar NMR

Pada tahun 1924, Pauli menduga bahwa inti-inti atom tertentu memiliki sifat-sifat spin dan momen magnetik. Bila inti-inti ini diletakkan pada medan magnet, tingkatan energinya akan terurai. Bloch dan Purcell menunjukkan bahwa inti atom mengabsorpsi radiasi elektromagnetik pada medan magnet yang lebih kuat, dikarenakan tingkat energi yang terurai menginduksikan gaya magnet (Khopkar, 1990). Bilangan kuantum spin inti ditunjukkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5. Bilangan Kuantum Spin Inti

No.	Jumlah neutron	Jumlah proton	Bilangan spin	Contoh
i	genap	genap	0	^{32}S , ^{28}Si , ^{12}C , ^{16}O
ii	genap	ganjil	$\frac{1}{2}$	^1H , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P
iii	ganjil	genap	$\frac{1}{2}$	^{13}C
iv	ganjil	ganjil	1	^2H , ^{14}N
v	genap	ganjil	$\frac{3}{2}$	^{29}Br , ^{11}B
vi	ganjil	genap	$\frac{5}{2}$	Te

Sumber: Khopkar, S.M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press, Jakarta hal. 310

Inti yang memiliki baik jumlah proton yang ganjil atau jumlah neutron yang ganjil, tetapi tidak keduanya ganjil, mempunyai bilangan kuantum spin sebesar $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{5}{2}$, dan seterusnya, seperti H^1 , N^{15} , F^{19} , dan P^{31} . Inti tersebut berupa bola berspin muatan yang bersirkulasi menghasilkan suatu medan magnet, seperti arus listrik dalam sebuah kumparan kawat (Khopkar, 1990). Berdasarkan jumlah proton dan neutronnya, inti dapat dibedakan menjadi (Khopkar, 1990):

1. Inti dengan spin nol, yaitu baik jumlah neutron maupun jumlah protonnya merupakan bilangan bulat.
2. Inti dengan spin $\frac{1}{2}$, $3/2$, $5/2$, dan seterusnya, dengan jumlah proton atau jumlah neutron yang merupakan bilangan ganjil.
3. Inti dengan spin bilangan bulat, yang memiliki jumlah neutron maupun jumlah proton yang berjumlah ganjil.

B. Pengukuran Spektrum NMR

Spektrum NMR dapat dihasilkan dengan 2 metode. Metode pertama serupa dengan cara memperoleh spektrum optis, yaitu sinar absorpsi diukur pada saat frekuensi elektromagnetik divariasikan. Metode kedua adalah dengan menggunakan oskilator frekuensi radio yang konstan, dan memvariasikan medan magnet H_0 secara kontinu (Khopkar, 1990).

Instrumen NMR yang digunakan dapat berupa NMR resolusi tinggi atau model puncak lebar. Instrumen NMR resolusi tinggi mampu menguraikan struktur halus yang sesuai dengan puncak absorpsi, dengan menggunakan medan magnet 7000 G (Gauss). Sedangkan, instrumen NMR berpuncak lebar digunakan untuk menganalisis unsur secara kuantitatif, dan mengamati lingkungan fisis suatu inti. Instrumen ini menggunakan magnet dengan kekuatan beberapa ribu Gauss, juga lebih sederhana dan murah dibandingkan dengan NMR resolusi tinggi. Spektroskopi NMR resolusi tinggi diperlukan model yang canggih (Khopkar, 1990).

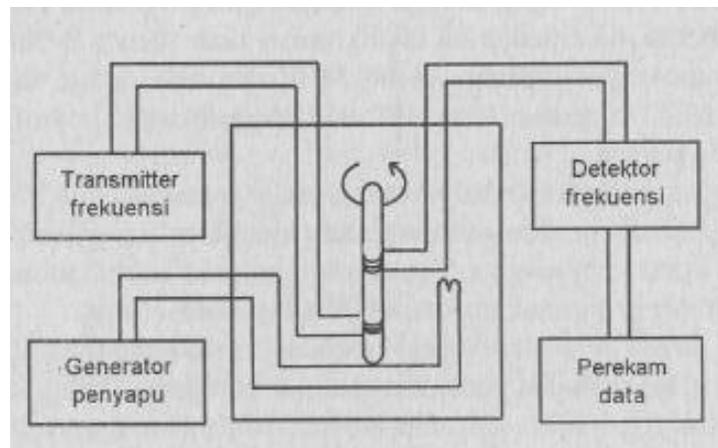
Pada senyawa dengan pusat asimetris, ditemukan bahwa seperti halnya dengan sifat fisik lain dari antipoda optik - kecuali untuk interaksinya dengan

cahaya terpolarisasi - bentuk D-dan-L tidak dapat dibedakan. Spektrum NMR mereka karena itu bersifat superimposable (tidak dapat dihindarkan satu sama lain) dan juga sesuai persis dengan rasemat. Namun, dimungkinkan melalui penggunaan pelarut yang aktif secara optik untuk menghasilkan dalam suatu rasemat, suatu pergeseran kimia antara sinyal-sinyal dari dua isomer optik (Gunther, 2013).

C. Instrumentasi dan Teknik NMR

Instrumentasi NMR terdiri atas komponen-komponen utama berikut (Khopkar, 1990):

A. Magnet



Gambar 6. Instrumentasi NMR(Khopkar, 1990).

Akurasi dan kualitas instrumen NMR bergantung pada kekuatan magnetnya. Resolusi akan bertambah seiring dengan kenaikan kekuatan medannya. Magnet permanen memiliki kuat medan 7046-14.002 G, sesuai dengan frekuensi oskilator proton antara 30-60 MHz. Termostat yang baik juga diperlukan karena magnet bersifat peka terhadap temperatur. Oleh karena itu, elektromagnet memerlukan sistem pendingin (Khopkar, 1990).

Elektromagnet yang sering tersedia di pasaran memiliki frekuensi 60, 90, dan 100 MHz untuk proton. Spektroskopi NMR beresolusi tinggi dan bermagnet superkonduktor dengan frekuensi proton 470 MHz. Pengaruh fluktuasi medan dapat diatasi dengan sistem *frequency lock*, yang dapat berupa tipe pengunci eksternal atau internal. Pada tipe pengunci eksternal, wadah senyawa pembanding dengan sampel berada pada tempat terpisah, sedangkan pada tipe internal, senyawa pembanding larut bersama dengan sampel. Pada umumnya, senyawa pembanding yang digunakan adalah tetrametilsilan (TMS) (Khopkar, 1990).

B. Generator Medan Magnet untuk *Sweeping*

Suatu pasangan kumparan terletak sejajar terhadap permukaan magnet, digunakan untuk mengubah medan magnet pada *range* yang sempit. Dengan membuat variasi pada arus searah melalui kumparan ini, medan efektif dapat diubah dengan perbedaan sekitar 10^{-3} Gauss. Perubahan medan magnet ini disinkronisasikan secara linear dengan perubahan waktu. Untuk alat 60 MHz (proton), *range* sapuannya adalah 235×10^{-3} Gauss. Untuk F^{19} dan C^{13} , diperlukan sapuan frekuensi sebesar 10 KHz. (Khopkar, 1990).

C. Sumber Frekuensi Radio

Sinyal frekuensi oskilasi radio (transmitter) disalurkan pada sepasang kumparan yang posisinya 90° terhadap jalur dan magnet. Suatu oskilator tetap sebesar 60, 90, atau 100 MHz digunakan dalam spektroskopi NMR beresolusi tinggi (Khopkar, 1990).

D. Detektor Sinyal

Detektor pada NMR berupa sebuah kumparan yang mengitari sampel dan tegak lurus terhadap sumber. Fungsinya adalah untuk mendeteksi sinyal frekuensi radio yang dihasilkan oleh inti yang beresonansi (Khopkar, 1990).

E. Rekorder

Pencatat sinyal NMR disinkronisasikan dengan sapuan medan, sedangkan rekorder mengendalikan laju sapuan spektrum. Luas puncak dapat digunakan untuk menentukan jumlah relatif inti yang mengabsorpsi. Untuk analisis secara kuantitatif, luas puncak tidak dapat digantikan oleh tinggi puncak (Khopkar, 1990).

F. Tempat Sampel dan Probe

Tempat sampel berupa tabung gelas yang memiliki diameter sebesar 5 mm dan dapat diisi cairan sampai 0,4 mL. Sedangkan, probe sampel terdiri atas tempat kedudukan sampel, sumber frekuensi penyapu, dan kumparan detektor dengan sel pembanding.. Detektor dan kumparan pembanding diorientasikan pada 90° . Probe sampel mengelilingi tabung sampel dengan sumbu longitudinal pada ratusan rpm (Khopkar, 1990).

Untuk spektroskopi NMR beresolusi tinggi, sampel tidak boleh terlalu kental. Pada umumnya, digunakan konsentrasi larutan sebesar 2-15%. Pelarut yang baik untuk NMR sebaiknya tidak mengandung proton, seperti CS_2 dan CCl_4 . Pelarut-pelarut berdeuterium juga sering digunakan, seperti CDCl_3 atau C_6D_6 (Khopkar, 1990).