

**EFEK pH PADA STABILITAS LARUTAN
2,6-BIS(4-SULFONAMIDOBENZILIDENA)SIKLOHEKSANON DIANALISIS
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

SRI NURASIH

0606041125



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM EKSTENSI
DEPOK
2009**

**EFEK pH PADA STABILITAS LARUTAN
2,6-BIS(4-SULFONAMIDOBENZILIDENA)SIKLOHEKSANON DIANALISIS
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

SRI NURASIH

0606041125



DEPOK

2009


SKRIPSI : EFEK pH 7,0 DAN pH 10,0 PADA STABILITAS
LARUTAN 2,6-BIS(4-SULFONAMIDOBENZILIDENA)
SIKLOHEKSANON DIANALISIS SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DENSITOMETRI

NAMA : SRI NURASIH

NPM : 0606041125

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009

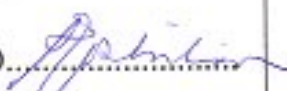

Drs. HAYUN, MSi

PEMBIMBING I


Drs. UMAR MANSUR, MSc

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana :

Penguji I : Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, MS, PhD.....

Penguji II : Dra. Sabarijah WittoEng, SKM.....

Penguji III : Dr. Berna Elya, MS.....

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji kepada sumber segala kebenaran dan ilmu pengetahuan. Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Shalawat dan salam tak lupa tercurah kepada nabi Muhammad *shallallahu 'alaihi wa sallam*.

Skripsi yang berjudul “Efek pH 7,0 dan pH 10,0 Pada Stabilitas Larutan 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon Dianalisis Secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri.” disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi, di Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Penelitian dalam rangka penyusunan skripsi ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain :

1. Bapak Drs. Hayun, MSi. selaku pembimbing I dan Bapak Drs. Umar Mansur, MSc. selaku pembimbing II atas bantuan, bimbingan dan saran selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Ibu Dr. Katrin MSi. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.

3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MSi selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA-UI.
4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia FMIPA-UI.
5. Seluruh staf pengajar, laboran terutama bapak H. Rustam Paun dan para karyawan Departemen Farmasi UI terutama bapak Imih, bapak Hadison, bapak Ma'ruf dan bapak Suroto.
6. Ibu, bapak, kakak dan adik di rumah yang selalu mendoakan saya.
7. Rekan-rekan sejawat farmasi ekstensi 2006 dan mahasiswa-mahasiswa KBI Kimia Farmasi yang telah memberikan dukungan dan semangatnya selama ini.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya yang juga banyak memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2009

ABSTRAK

2,6-Bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon adalah senyawa hasil dari klorosulfonasi 2,6-dibenzilidenasikloheksanon, yang kemudian dilakukan amidasi terhadap sulfonilklorida dengan ammonia. Salah satu sifat yang harus diketahui dari senyawa calon obat adalah data stabilitas. Pada penelitian kali ini dilakukan uji pengaruh pH terhadap stabilitas larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan metode uji stabilitas dipercepat dan dianalisis secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. Dapar yang digunakan adalah pH 7,0 dan pH 10,0 dengan suhu 50⁰, 60⁰, dan 70⁰ C. Kondisi analisis menggunakan lempeng silica gel F254 sebagai fase diam, campuran pelarut diklormetan : metanol (9:1) sebagai fase gerak dan dianalisis pada panjang gelombang 334 nm. Hasil penelitian ini menunjukkan koefisien variasi kurang dari 2 %. Kurva kalibrasi dilakukan pada rentang 60-200 ppm menghasilkan linieritas 0.9975 dengan batas deteksi 11.8086 ppm dan batas kuantitasi 39.33619 ppm. Hasil dari stabilitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon pada pH 7,0 memiliki $k_1 = 0,13 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 17,67 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,80 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 5,30 jam. Sedangkan pada pH 10,0 suhu 25⁰C memiliki $k_1 = 7,01 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 1,14 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,02 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 0,10 jam. Dari data diatas dapat diambil kesimpulan bahwa pH 7,0 lebih stabil dibandingkan dengan pH 10,0.

Kata kunci : Kromatografi Lapis Tipis Densitometri, 2,6-Bis(4-sulfonamido-
benzilidena)sikloheksanon, Uji Stabilitas.

xi + 70 hal; 13 gbr.; 8 tab.; 5 lamp.

Bibliografi : 22 (1976-2009).



ABSTRACT

2,6-Bis(4-sulfonamidobenzylidene)cyclohexanone is a new substance from chlorosulfonasi 2,6-dibenzylidenecyclohexanone which is amidated to sulfonilchlorida with ammonia. One of the characteristics that must be known from new drug standard is the stability data. In this research has done the effect of pH to solvent 2,6-bis(4-sulfonamidobenzylidene)cyclohexanone with accelerated stability test and analysed by Thin Layer Chromatography Densitometry. Buffers that have been used were pH 7,0 and pH 10,0 with temperature of 50⁰C, 60⁰C, 70⁰C. Analysis condition used silica gel F254 plate as static phase, solvent mixture as mobile phase was dichlormetan:metanol (9:1) and analysed in 334 nm wavelenght. The coefficient of variation was less than 2%. Calibration curve done in range of 60-200 ppm resulting linearity 0,9975 with limit of detection 11.8086 ppm dan limit of quantitation 39.33619 ppm. The result of stability 2,6-bis(4-sulfonamidobenzylidene)cyclohexanone in pH 7,0 at 25⁰C had $k_1 = 0,13$ hours⁻¹, activation energy (E_a) = 17,67 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,80 hour and half time ($t_{1/2}$) = 5,30 hours, whereas in pH 10,0 at 25⁰C had $k_1 = 7,01$ hours⁻¹, activation energy (E_a) = 1,14 kkal mol⁻¹ *shelf life* (t_{90}) = 0,02 hour and half time ($t_{1/2}$) = 0,10 hour. So from the data above, it can be taken conclusion that pH 7,0 more stabil than pH 10,0.

Key word : Thin Layer Chromatography Densitometry, 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzylidene)Cyclohexanone, Stability test,

xi + 70 pages; 13 pict; 8tab.; 5 encl.

Bibliography: 22 (1976-2009)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Kestabilan.....	4
1. Perubahan Kimia	5
2. Orde Reaksi	7
3. Penentuan Orde Reaksi	8
B. Pengaruh Temperatur Terhadap Kecepatan Reaksi.....	9
C. Uji Dipercepat (<i>Accelerated Test</i>).....	10
D. 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon.....	11
E. Kromatografi Lapis Tipis.....	12
1. Kromatografi.....	12
2. Penggunaan KLT.....	13
3. Sistem KLT.....	15

	4. Teknik Pengembangan.....	16
	5. Perhitungan Faktor Retardasi.....	18
	6. Densitometri.....	19
F.	Validasi Metode Analisis.....	20
	1. Kecermatan.....	21
	2. Keseksamaan.....	22
	3. Selektivitas.....	23
	4. Linieritas dan Rentang.....	23
	5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	24
BAB III	ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA	
A.	Alat.....	26
B.	Bahan.....	26
C.	Cara Kerja.....	27
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
A.	Hasil	34
B.	Pembahasan.....	36
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
A.	Kesimpulan	42
B.	Saran.....	43
DAFTAR ACUAN.....		44

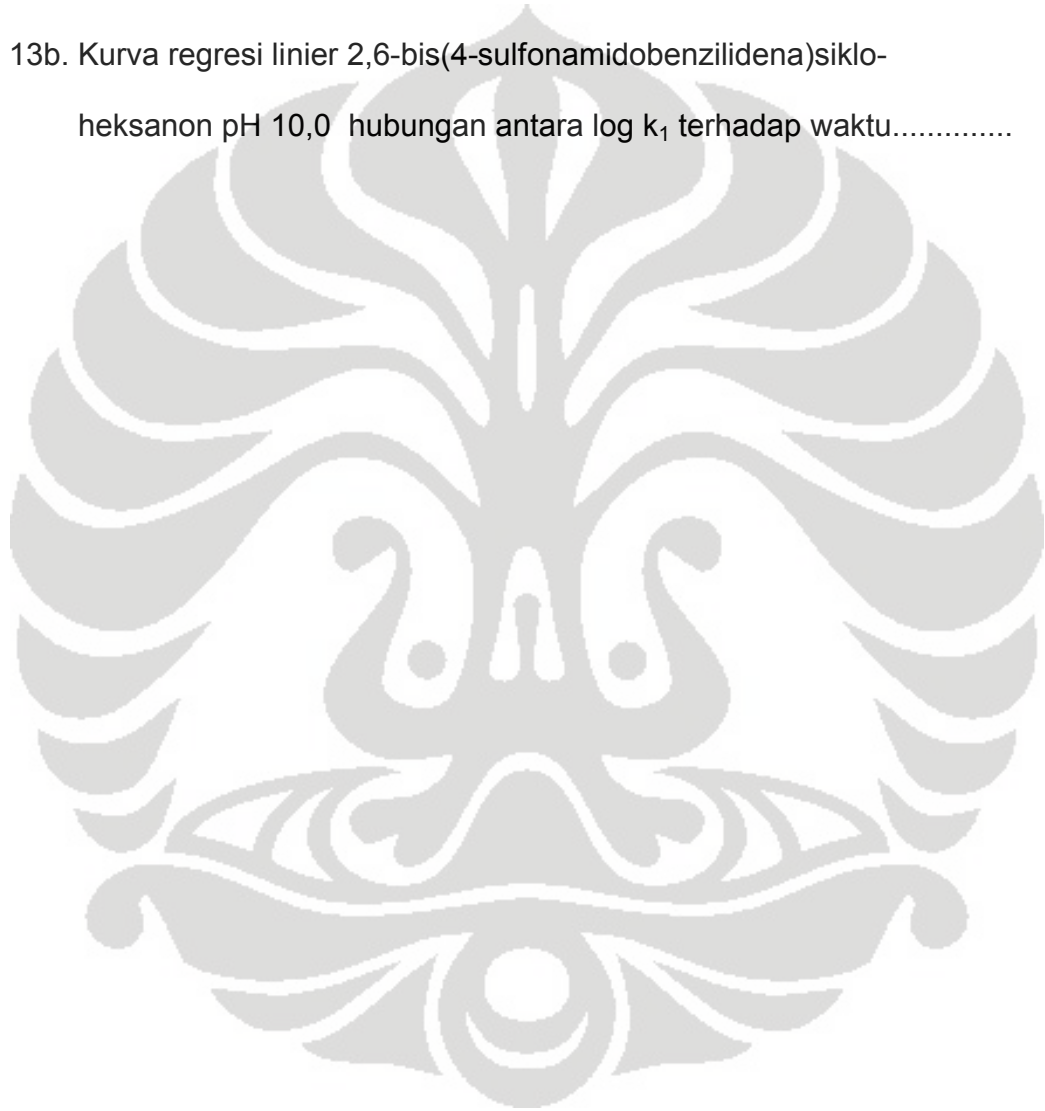
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Penguraian obat yang dipercepat pada suhu yang dinaikkan.....	10
2. Kurva arrhenius untuk memperkirakan kestabilan obat pada suhu kamar.....	47
3. Struktur 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon.....	11
4. Faktor retardasi.....	18
5. Alat <i>Tlc Scanner</i> dan komputer yang dilengkapi dengan program wincats.....	48
6. Kurva serapan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 10 ppm pelarut metanol pada 200-400 nm	48
7a. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih diklormetan:metanol (9:1).....	49
7b. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih kloroform:metanol (9,5:0,5).....	49
7c. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih kloroform:metanol (8,5:1,5).....	50
7d. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih diklormetan:metanol (9,5:0,5).....	50
7e. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon	

100 ppm dengan fase gerak terpilih diklormetan:etil asetat (5:5).....	51
7f. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih etil asetat:heksan (5:5).....	51
7g. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih etil asetat:heksan (7:3).....	52
7h. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih toluen:etil asetat (9:1).....	52
8. Kurva serapan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 100 ppm pelarut metanol pada 334 nm dengan <i>Tlc Scanner</i>	53
9. Kurva kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon.....	53
10a. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon 64,87 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	54
10b. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon 86,49 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	54
10c. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon 108,11ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	55
10d. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon 129,74 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	55
10e. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)	

	sikloheksanon 179,28 ng dengan fase gerak diklormetan: metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	56
10f.	Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 194,61 ng dengan fase gerak diklormetan: metanol (9:1) pada panjang gelombang 334 nm.....	56
11.	Kurva selektivitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon dengan fase gerak diklormetan: methanol (9:1).....	57
12a.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 7,0 pada suhu 50 ⁰ C hubungan antara ln (c) Kadar terhadap waktu.....	57
12b.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 7,0 pada suhu 60 ⁰ C hubungan antara ln (c) kadar terhadap waktu.....	58
12c.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 7,0 pada suhu 70 ⁰ C hubungan antara ln (c) kadar terhadap waktu	58
12d.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 10,0 pada suhu 50 ⁰ C hubungan antara ln (c) kadar terhadap waktu	59
12e.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 10,0 pada suhu 60 ⁰ C hubungan antara ln (c) Kadar terhadap waktu	59
12f.	Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo-	

heksanon pH 10,0 pada suhu 70°C hubungan antara ln (c) Kadar terhadap waktu.....	60
13a. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 7,0 hubungan antara log k ₁ terhadap waktu.....	60
13b. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo- heksanon pH 10,0 hubungan antara log k ₁ terhadap waktu.....	61

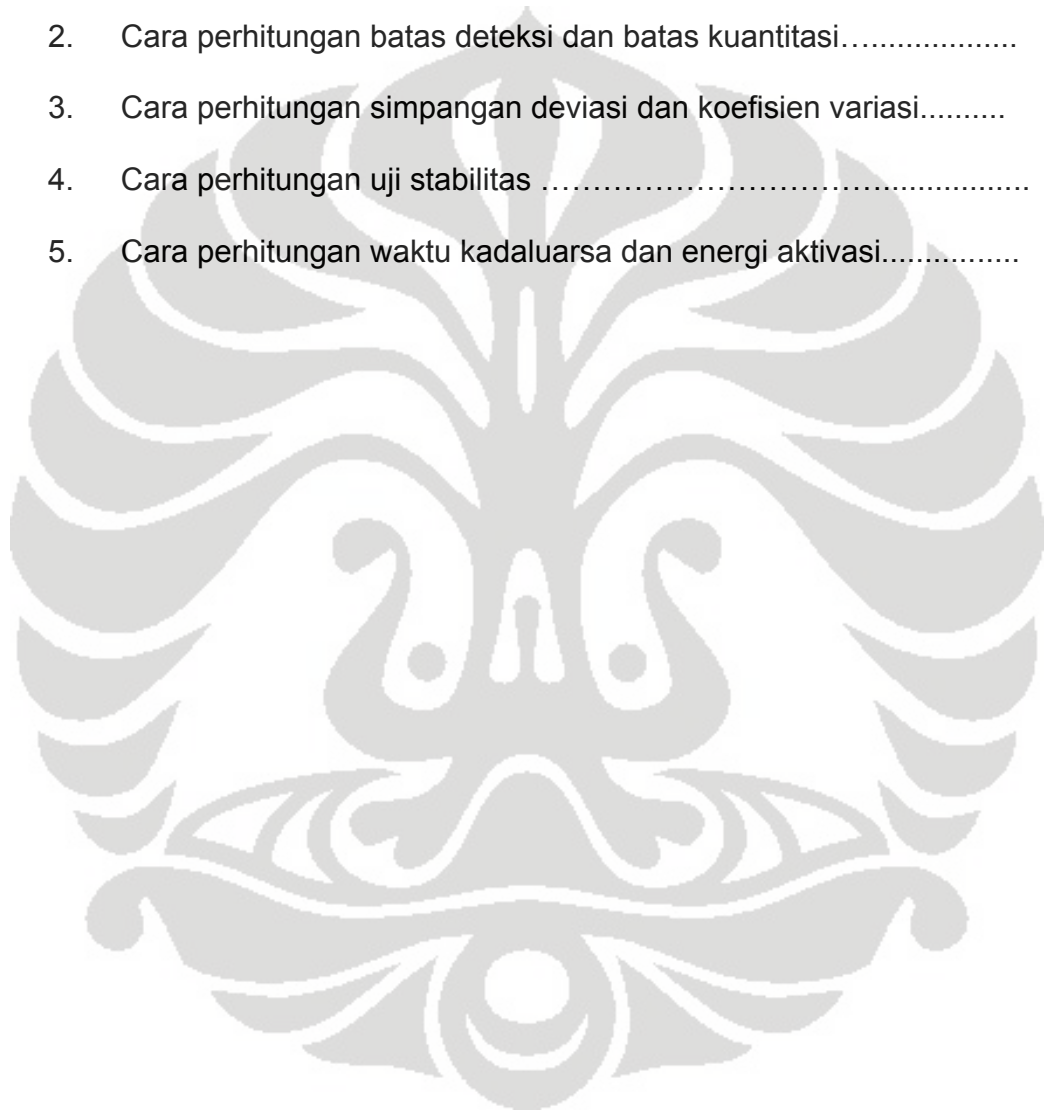


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Uji stabilitas dipercepat senyawa 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon dalam larutan pH 7,0 dan pH 10,0	33
2. Daftar Rf pada beberapa macam fase gerak.....	62
3. Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linieritas	63
4. Hasil perhitungan limit deteksi dan limit kuantitas.....	64
5. Hasil perhitungan uji presisi.....	65
6a. Hasil perhitungan uji stabilitas pada pH 7,0.....	66
6b. Hasil perhitungan uji stabilitas pada pH 10,0.....	67
7a. Data hasil analisis regresi linier dari data uji stabilitas pada suhu 50 ⁰ , 60 ⁰ dan 70 ⁰ C pH 7,0.....	68
7b. Data hasil analisis regresi linier dari data uji stabilitas pada suhu 50 ⁰ , 60 ⁰ dan 70 ⁰ C pH 10,0.....	68
8a. Data hasil perhitungan logaritma tetapan kecepatan degradasi (k) pH 7,0 pada suhu 50 ⁰ , 60 ⁰ , dan 70 ⁰ C.....	69
8b. Data hasil perhitungan logaritma tetapan kecepatan degradasi (k) pH 10,0 pada suhu 50 ⁰ , 60 ⁰ , dan 70 ⁰ C.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara perhitungan kurva kalibrasi.....	70
2. Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi.....	71
3. Cara perhitungan simpangan deviasi dan koefisien variasi.....	72
4. Cara perhitungan uji stabilitas	73
5. Cara perhitungan waktu kadaluarsa dan energi aktivasi.....	74



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Senyawa 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon merupakan senyawa hasil dari klorosulfonasi 2,6-dibenzilidenasikloheksanon, yang kemudian dilakukan amidasi terhadap produk sulfonilklorida dengan ammonia(1). Senyawa 2,6-Dibenzilidenasikloheksanon dan turunannya dianggap sebagai senyawa modifikasi kurkumin. Merujuk pada aktivitas kurkumin, sejumlah turunan 2,6-dibenzilidenasikloheksanon telah disintesis dan diuji aktivitasnya. Hasil-hasil uji aktivitas antara lain: senyawa 2,6-Dibenzilidenasikloheksanon dan 3 (tiga) turunannya yaitu 2,6-bis(3-metoksi-4-hidroksibenzilidena)sikloheksanon; 2,6-bis(4-metoksibenzilidena)siklo-heksanon; dan 2,6-bis(4-metilbenzilidena)sikloheksanon mempunyai aktivitas koleritika (2). Senyawa 2,6-bis(3-metoksi-4-hidroksibenzilidena)siklo-heksanon dan 2,6-bis(3,5-dimetil-4-hidroksibenzilidena)sikloheksanon mempunyai aktivitas inhibitor terhadap siklooksigenase (antiinflamasi) (3). Senyawa hasil sintesis 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon diharapkan menunjukkan aktivitas farmakologi tersebut.

Salah satu sifat yang harus diketahui dari bahan baku obat adalah data stabilitas. Stabilitas bahan obat diperlukan sebagai

pertimbangan dalam rancangan formula yang tepat untuk sediaan. Suatu senyawa meskipun memiliki efek farmakologi yang baik, memiliki efek samping yang kecil tetapi tidak stabil, maka efektivitasnya menjadi sangat rendah setelah digunakan sebagai obat (4).

Stabilitas obat perlu mendapat perhatian yang lebih besar, hal ini adalah untuk mengetahui kapan suatu obat masih dapat dipertanggungjawabkan mutunya. Stabilitas merupakan kemampuan suatu produk farmasi untuk mempertahankan sifat kimia fisika, mikrobiologi, dan biofarmasi dalam batas-batas yang ditentukan selama masa edarnya. Bila khasiat obat dan kualitasnya tidak berubah selama proses produksi sampai ke tangan pasien maka obat tersebut dapat dikatakan stabil. Untuk itu perlu diketahui faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi kestabilan suatu zat sehingga dapat dipilih suatu kondisi dimana kestabilan obat tersebut optimum.

Uji stabilitas adalah suatu usaha untuk mengetahui perubahan konsentrasi zat aktif obat setelah obat tersebut mengalami perlakuan tertentu, misalnya penyimpanan, pemanasan, penyinaran dan pencampuran dengan bahan lain. Metode uji stabilitas telah lama dilakukan, mengevaluasi kestabilan suatu sediaan farmasi dengan pengamatan pada temperatur kamar ternyata memerlukan waktu yang lama. Untuk mempercepat analisis dapat dilakukan “uji stabilitas kimia dipercepat” yaitu dengan mengamati kadar suatu zat pada suhu tinggi (5).

Salah satu penyebab ketidakstabilan obat adalah terjadinya degradasi akibat reaksi hidrolisis. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap laju degradasi diantaranya adalah suhu dan pH. Penelitian ini merupakan penelitian uji stabilitas larutan senyawa hasil sintesis 2,6-bis-(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon, menggunakan metode uji stabilitas dipercepat, dilakukan pada pH 7,0 dan pH 10,0 dengan berbagai suhu. Kadar senyawa dalam larutan dianalisis secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui pengaruh pH terhadap stabilitas larutan 2,6-bis-(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon yang dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis Densitometri.
2. Mengetahui tetapan kecepatan degradasi (k_1) pada suhu 25°C (suhu kamar), energi aktivasi (E_a), *shelf life* (t_{90}), dan waktu paro ($t_{1/2}$).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. KESTABILAN

Stabilitas adalah kemampuan suatu produk farmasi untuk mempertahankan sifat kimia fisika, mikrobiologi, dan biofarmasi dalam batas-batas yang ditentukan selama masa edarnya. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi kestabilan suatu obat atau bahan obat antara lain : stabilitas produk farmasi tergantung pada faktor-faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban dan cahaya; pada sisi lain adalah faktor-faktor yang berhubungan dengan produk, seperti sifat kimia dan fisika dari bahan aktif dan eksipien, bentuk sediaan dan komposisinya, proses pembuatan, sistem penutupan-wadah serta sifat bahan pengemas (6). Pada umumnya, penentuan kestabilan suatu zat dapat dilakukan dengan cara kinetika kimia. Cara ini tidak memerlukan waktu yang lama sehingga praktis digunakan dalam bidang farmasi. Prinsip kinetika kimia dalam bidang farmasi juga diterapkan dalam proses disolusi, proses absorpsi, distribusi dan eliminasi. Jumlah zat padat yang melarut kedalam larutan per satuan waktu disebut waktu disolusi. Jumlah zat yang diabsorpsi dari tempat pemberian per satuan waktu adalah laju absorpsi. Dan jumlah obat yang dieliminasi per satuan waktu disebut laju eliminasi.

1. Perubahan Kimia

Reaksi kimia dari zat-zat dalam sediaan farmasi yang dapat menyebabkan kerusakan pada sediaan tersebut diantaranya reaksi hidrolisis, oksidasi- reduksi, dan fotokimia (5,7).

a. Reaksi Hidrolisis

Hidrolisis adalah reaksi penguraian suatu garam oleh air. Kecepatan hidrolisis ini dipengaruhi oleh temperatur dan pH larutan. (5,7).

b. Reaksi Oksidasi-Reduksi

Reaksi oksidasi-reduksi terjadi karena adanya molekul oksigen, hidrogen dan radikal bebas sehingga terjadi perpindahan elektron dari suatu atom atau ion yang terkandung didalamnya. Kecepatan reaksi oksidasi dipengaruhi oleh temperatur, dan radiasi (5,7,8).

c. Reaksi Fotokimia

Radiasi ultraviolet dengan tingkat energi yang tinggi akan menyebabkan banyak reaksi penguraian. Untuk melindungi dari formula yang sensitif terhadap cahaya umumnya digunakan wadah kaca yang berwarna (5).

2. Orde Reaksi

Orde reaksi adalah jumlah atom atau molekul yang terlibat dalam reaksi yang konsentrasinya menentukan laju reaksi.

a. Orde reaksi 0

Reaksi ini terjadi bila laju reaksi tidak bergantung kepada konsentrasi pereaksinya. Perubahan konsentrasi yang konstan akan terjadi setiap waktu.

$$-dc/dt = k_0$$

Tanda negatif menunjukkan berkurangnya konsentrasi persatuan waktu. Persamaan laju dapat diintegrasikan antara konsentrasi awal C_0 pada waktu $t = 0$ dan konsentrasi C_t setelah t jam.

$$dC = -k_0 dt$$

$$C_t - C_0 = -k_0 t$$

$$\text{atau } C_t = C_0 - k_0 t \quad (1)$$

b. Orde reaksi 1

Reaksi ini terjadi bila laju reaksi bergantung kepada konsentrasi salah satu pereaksi.

$$-dC/dt = k C$$

$$dC/C = -k dt$$

$$\ln C - \ln C_0 = -k(t-0)$$

$$\ln C - \ln C_0 = -k t \quad (2)$$

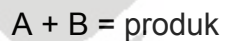
dalam bentuk eksponensial persamaan ini menjadi

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (3)$$

Persamaan ini menunjukkan bahwa dalam reaksi orde satu, konsentrasi berkurang secara eksponensial terhadap waktu.

c. Orde dua

Bila dua molekul bertabrakan, laju reaksi biomolekuler dijelaskan dengan persamaan orde dua. Untuk reaksi



Maka laju reaksi bergantung kepada konsentrasi A atau B yang masing-masing dipangkatkan satu, sehingga laju penguraian A sama dengan laju penguraian B dan sebanding dengan hasil kali reaktan.

$$-d[A]/dt = -d[B]/dt = k [A] [B]$$

Secara umum persamaan laju reaksi tingkat dua adalah :

$$1/C_t - 1/C_0 = k t$$

3. Penentuan orde reaksi

Penentuan orde reaksi dapat dilakukan dengan cara-cara sebagai berikut :

- a. Dengan mensubstitusikan konsentrasi zat yang diperoleh ke dalam persamaan orde reaksi, bila didapat harga k yang relatif konstan berarti reaksi berjalan pada orde tersebut.
- b. Dengan membuat grafik hubungan antara konsentrasi yang diperoleh terhadap waktu. Jika hubungan yang diperoleh sesuai dengan salah satu grafik, maka reaksi berjalan pada orde tersebut. Grafik nol adalah hubungan konsentrasi pada waktu t terhadap waktu, orde satu adalah hubungan log konsentrasi terhadap waktu dan orde dua adalah hubungan antara $1/C$ (satu per konsentrasi) terhadap waktu.
- c. Dengan cara waktu paro. Waktu paro adalah waktu yang dibutuhkan suatu obat untuk terurai separuh dari konsentrasi awal.

Secara umum waktu paro ($t_{1/2}$) adalah $1/C^{n-1}$. Jika dilakukan dua percobaan dengan konsentrasi yang berbeda maka $t_{1/2}$ dapat dibandingkan sebagai berikut :

$$\frac{(t)_{1/2}}{(t)_{1/2}} = \frac{(C)^{n-1}}{(C)^{n-1}}$$

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi adalah temperatur, kekuatan ion, pH, pelarut yang digunakan, konstanta dielektrik dan katalisator lainnya. Pada penelitian ini faktor yang dipilih untuk mempengaruhi kecepatan reaksi adalah faktor temperatur.

B. PENGARUH TEMPERATUR TERHADAP KECEPATAN REAKSI

Temperatur berpengaruh terhadap kecepatan suatu reaksi. Semakin tinggi temperatur, reaksi yang terjadi umumnya semakin cepat, jadi harga k (konstanta kecepatan reaksi) semakin besar. Metode uji yang dipercepat untuk produk-produk farmasi yang didasarkan pada prinsip-prinsip kinetika kimia ditunjukkan oleh Garret dan Carper (5). Kecepatan berbagai reaksi bertambah kira-kira dua atau tiga kalinya tiap kenaikan 10°C. Pengaruh suhu terhadap laju ini pertama kali dikemukakan oleh Arrhenius dengan persamaan sebagai berikut :

$$k = A e^{-E_a/RT} \dots\dots\dots \text{persamaan (1)}$$

$$\text{atau } \log k = \log A - \frac{E_a}{2.303RT} \dots\dots\dots \text{persamaan (2)}$$

Keterangan :

k = tetapan kecepatan degradasi

A = tetapan yang disebut faktor Arrhenius atau faktor frekuensi

E_a = energi aktivasi

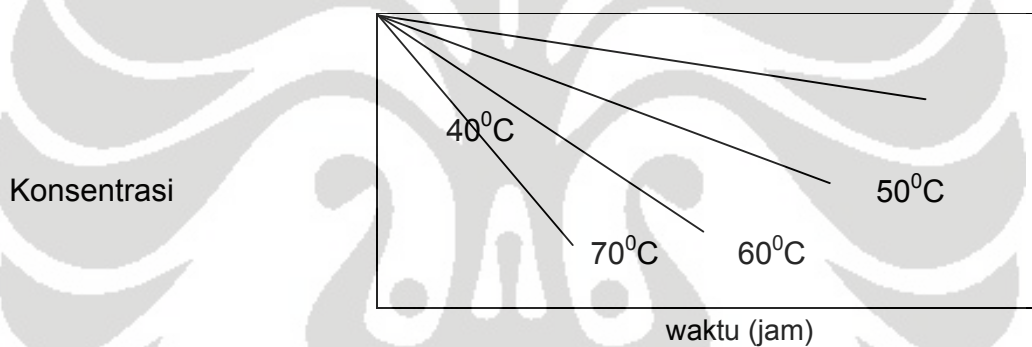
R = tetapan gas yaitu 1,987 kal/° K mol

T = suhu mutlak

Dengan menentukan harga k pada berbagai suhu dan menggambarkan 1/T terhadap log k, diperoleh E_a dari kemiringan garis dan A dari perpotongan. Ketentuan ini hanya berlaku untuk reaksi yang mengikuti persamaan Arrhenius dimana kurva log k terhadap 1/T akan memberikan garis lurus.

C. UJI DIPERCEPAT (*ACCELERATED TEST*)

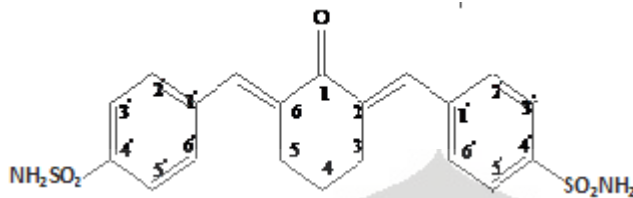
Penentuan kestabilan suatu sediaan farmasi dapat dilakukan dengan metode uji dipercepat didasarkan pada prinsip kinetika kimia. Pada metode ini nilai laju degradasi (nilai k) untuk penguraian obat pada berbagai suhu yang dinaikkan diperoleh dengan menggambarkan beberapa fungsi konsentrasi terhadap waktu (7). Beberapa suhu yang digunakan adalah 40°C , 50°C , 60°C , dan 70°C (3,8).



Gambar 1. Penguraian obat yang dipercepat pada suhu yang dinaikkan (5).

Logaritma laju penguraian spesifik kemudian digambarkan terhadap kebalikan suhu mutlak dan hasil berupa garis lurus diekstrapolasikan sampai suhu ruang. Harga k_{25} digunakan untuk memperoleh pengukuran kestabilan obat pada kondisi penyimpanan biasa. Kurva Arrhenius untuk memperkirakan kestabilan obat pada suhu kamar dapat dilihat pada Gambar 2.

D. 2,6-BIS(4-SULFONAMIDOBENZILIDENA)SIKLOHEKSANON



Gambar 3. Struktur 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon.

Senyawa 2,6-Bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon merupakan senyawa hasil dari klorosulfonasi 2,6-dibenzilidenasikloheksanon, yang kemudian dilakukan amidasi terhadap produk sulfonilklorida dengan ammonia (1). Senyawa 2,6-Dibenzilidenasikloheksanon dan turunannya dianggap sebagai senyawa modifikasi kurkumin. Merujuk pada aktivitas kurkumin, sejumlah turunan 2,6-dibenzilidenasikloheksanon telah disintesis dan diuji aktivitasnya. Hasil-hasil uji aktivitas antara lain : 2,6-Dibenzilidena-sikloheksanon dan 3 (tiga) turunannya yaitu 2,6-bis(3-metoksi-4-hidroksibenzilidena)sikloheksanon; 2,6-bis(4-metoksibenzilidena)sikloheksanon; dan 2,6-bis(4-metilbenzilidena)sikloheksanon mempunyai aktivitas koleritika (2), 2,6-bis(3-metoksi-4-hidroksibenzilidena)sikloheksanon dan 2,6-bis(3,5-dimetil-4-hidroksibenzilidena)sikloheksanon mempunyai aktivitas inhibitor terhadap siklooksigenase (antiinflamasi) meskipun aktivitasnya masih rendah daripada aspirin dan indometasin (3).

Modifikasi struktur akan merubah sifat fisiko kimia yang akan berpengaruh pada aktifitasnya. Hasil studi hubungan struktur-aktivitas (SAR) yang ekstensif terhadap kelompok senyawa diarilheterosiklik menunjukkan bahwa gugus SO_2NH_2 atau SO_2Me pada posisi *para* dari salah satu cincinnya dibutuhkan untuk menghasilkan inhibitor COX-2 yang optimum selektivitas dan potensinya (1). Substitusi SO_2NH_2 terhadap 2,6-dibenzilidena-sikloheksanon yang menghasilkan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo-heksanon diharapkan menunjukkan aktivitas antiinflamasi/inhibitor COX, dan diharapkan memiliki aktivitas lebih baik daripada turunan 2,6-dibenzilidenasikloheksanon sebelumnya.

E. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

1. Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion.

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut lainnya, yang

terelusi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai zat penjerap seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan, silica gel dan resin penukar ion atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (10).

Kromatografi lapis tipis umumnya digunakan sebagai metode identifikasi zat aktif karena mudah pelaksanaannya, dapat digunakan untuk berbagai jenis sampel, sensitifitas tinggi, pemisahan cepat dan relative murah. Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk menguji kemurnian suatu senyawa, untuk memisahkan dan mengidentifikasi komponen dalam campuran dan untuk analisis kuantitatif dari satu atau lebih komponen (11).

Bila fase diam berupa zat padat aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography) dan bila berupa zat cair, maka teknik ini dikenal dengan kromatografi pembagian (partition chromatography) (12).

2. Penggunaan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sering digunakan untuk analisis kualitatif skala besar dan dapat juga digunakan untuk analisis kuantitatif. Saat ini metode KLT banyak digunakan untuk menganalisis kemurnian dari suatu senyawa secara sederhana, memisahkan dan

mengidentifikasi komponen-komponen zat dalam suatu campuran, menganalisis komponen-komponen yang terkandung dalam suatu campuran senyawa secara kuantitatif.

Penggunaan metode KLT semakin luas dapat disebabkan metode ini memiliki banyak kelebihan, diantaranya adalah (11):

- a. Merupakan metode yang sederhana dan alat yang digunakan relatif lebih murah.
- b. Polaritas pelarut atau jenis campuran pelarut dapat diubah berdasarkan percobaan, mudah untuk mengubah fase gerak.
- c. Fase gerak diuapkan sebelum deteksi dilakukan sehingga tidak mengganggu determinasi posisi bercak larutan.
- d. KLT tidak memerlukan kemurnian sampel yang sama seperti yang diperlukan dalam KCKT. Ketidakmurnian sampel mula-mula dapat dipindahkan oleh fase gerak atau tertinggal pada bercak awal sehingga tidak mempengaruhi hasil akhir analisis. Jadi, metode purifikasi untuk analisis dengan KLT sederhana.
- e. Memungkinkan untuk mengelusi beberapa cuplikan sekaligus, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk jumlah sampel yang banyak dapat lebih singkat.
- f. Jumlah cuplikan dan pelarut yang digunakan kecil.
- g. Memungkinkan dilakukan penotolan cuplikan berganda.
 - h. Waktu yang diperlukan untuk analisis relatif lebih cepat.

Kriteria zat yang dapat dianalisa dengan KLT yaitu: dapat terdeteksi pada kromatogram, dapat dilarutkan, dapat elusi dengan fase gerak, tidak bersifat *volatile*, sehingga tidak menguap selama proses elusi dan pengeringan kromatogram, harus stabil selama poses kromatografi, baik terhadap cahaya, udara, dan pelarut yang digunakan (13).

3. Sistem KLT (14)

Sistem KLT dapat diatur dengan mengubah sifat permukaan penjerap atau dengan mengubah-ubah kepolaran dari fase gerak. Cara mengubah fase gerak sering dilakukan karena lebih mudah (15).

a. Fase Diam

Penjerap untuk KLT umumnya yang paling banyak digunakan adalah silika gel (SiO_2) dan alumina (Al_2O_3). Silika gel merupakan penjerap yang bersifat asam, sehingga lebih sering digunakan untuk memisahkan senyawa yang bersifat asam. Sedangkan alumina bersifat basa digunakan untuk senyawa yang bersifat basa. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya pengikatan secara kuat senyawa dengan penjerap karena ikatan ion diantara keduanya. Selain silika dan alumina juga digunakan penjerap lain seperti selulosa dan poliamida.

Dalam perkembangan KLT, telah diciptakan sistem penjerap yang lebih baik yang dikenal dengan *High Pressure Thin Layer Chromatography* (HPTLC), merupakan lempeng KLT yang dilapisi dengan silika gel dengan

ukuran partikel yang lebih kecil (5-7 μ m) dan homogen, dengan tingkat ketebalan yang kecil (200 μ m). Lempeng ini memiliki tingkat pemisahan yang lebih baik, waktu pemisahan lebih singkat dan membutuhkan jumlah cuplikan yang lebih sedikit.

b. Fase Gerak

Polaritas dari pelarut yang digunakan sebagai fase gerak dalam KLT merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi lewatnya suatu komponen. Fase gerak yang polar akan bersaing dengan molekul yang bersifat polar dalam permukaan penjerap dan akan melarutkan bagian yang bersifat polar pula. Semakin polar fase gerak yang digunakan, semakin cepat pula membawa molekul-molekul yang bersifat polar melewati fase diam. Jika fase gerak yang digunakan terlalu polar, lajunya akan semakin cepat dan menghasilkan sedikit atau bahkan tidak terjadi pemisahan dalam suatu campuran.

Fase gerak dapat diubah-ubah dengan cara mengkombinasi pelarut agar diperoleh kepolaran yang tepat untuk pemisahan tertentu.

4. Teknik Pengembangan (16)

Pengembangan KLT dapat dilakukan secara menaik, namun dikenal juga cara pengembangan lainnya seperti pengembangan melingkar, mendatar dan menurun.

a. Pengembangan menaik

Teknik pengembangan ini merupakan teknik yang umum digunakan dan membutuhkan peralatan yang sederhana. Pada prinsipnya lempeng KLT dimasukkan ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan fase gerak. Fase gerak akan bergerak naik pada lempeng karena gaya kapilaritas.

b. Pengembangan melingkar

Teknik pengembangan ini dilakukan pada lempeng yang berbentuk lingkaran. Zat yang akan dielusi ditotolkan beberapa sentimeter dari pusat lingkaran. Fase gerak yang digunakan akan naik ke pusat lingkaran secara radial sampai ke tepi lingkaran(14).

c. Pengembangan mendatar

Prinsipnya sama seperti pengembangan menaik, hanya pada metode ini posisi lempeng mendatar (10).

d. Pengembangan menurun (16)

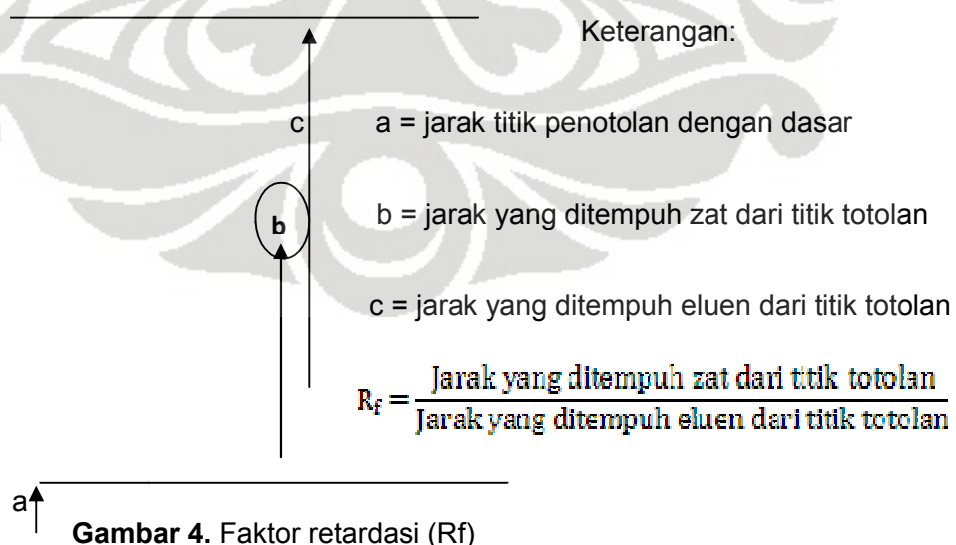
Cara pengembangan dengan arah berkebalikan dengan cara pengembangan menaik. Cara pengembangan ini biasanya dilakukan pada kromatografi kertas. Pada cara ini, pergerakan fase gerak juga dipengaruhi gaya gravitasi, jadi proses elusi berjalan lebih cepat.

e. Pengembangan dua dimensi

Selain teknik pengembangan di atas, dapat dilakukan juga teknik pengembangan dua dimensi. Pada teknik ini, elusi pertama selesai dilakukan dengan fase gerak tertentu, lempeng diangkat dan dikeringkan. Elusi selanjutnya dilakukan dengan memutar lempeng 90° dan dimasukkan ke dalam bejana yang berisi fase gerak yang berbeda dengan fase gerak pertama. Dengan cara ini dapat dilakukan pemisahan campuran yang kepolarannya sangat berbeda.

5. Perhitungan Faktor Retardasi (Rf) (12,17)

Faktor retardasi (Rf) adalah ratio antara jarak yang ditempuh oleh zat dengan jarak yang ditempuh oleh eluen dari titik totolan. Nilai Rf adalah spesifik untuk suatu zat, tetapi sering berbeda dengan yang dimuat di literatur karena nilai ini dipengaruhi oleh kondisi percobaan, seperti temperature, ukuran spot, kualitas lempeng, kejenuhan *chamber*, waktu perambatan.



6. Densitometri

Deteksi kromatogram merupakan tahap akhir yang penting dalam kromatografi. Teknik *in situ* merupakan cara deteksi yang umum digunakan mengidentifikasi dan mengkuantitasi kromatogram. Deteksi *in situ* dapat dilakukan dengan pengukuran densitometri. Densitometri merupakan metode yang sering digunakan pada KLT (16).

Pengukuran densitometri dapat dilakukan berdasarkan sifat absorpsifitas atau fluoresensi dari zat yang akan dianalisis (analit). Jika zat dalam bercak dapat mengabsorpsi spektrum UV atau dapat berfluoresensi, analisis dapat langsung dilakukan pada panjang gelombang yang sesuai. Zat yang tidak dapat mengabsorpsi sinar UV dapat dideteksi berdasarkan fluoresensi dari indikator fluoresens pada lempeng. Bila analit semakin dekat dengan panjang gelombang maksimum dari indikator fluoresens (254nm), maka sensitifitas pengukuran semakin tinggi. Sedangkan bila analit dapat berfluoresensi, mula-mula analit akan tereksitasi oleh sinar UV gelombang panjang, kemudian sinar emisi yang dipancarkan ketika zat kembali ke keadaan *steady state* dideteksi (17).

Metode pengukuran berdasarkan proses pemantulan dari fotometri resapan (*reflection-absorption photometry*), pemantulan dari fluorometri (*reflection-fluorometry*), dan transmisi dari fotometri resapan

(*transmission-absorption photometry*). Batas panjang gelombang yang lazim digunakan antara 200-700 nm (18).

Pada model transmisi, lempeng kromatografi dilewati seberkas cahaya dan energi yang ditransmisikan kemudian diukur. Sedangkan pada model refleksi, cahaya disorotkan pada lempeng kromatografi dan berkas cahaya yang dipantulkan kemudian diukur. Metode refleksi terutama efektif jika analit berfluoresensi dan fluoresensi itu dapat diukur. Pada kedua cara tersebut energi yang ditransmisikan atau dipantulkan, dideteksi lalu dikonversi dalam bentuk puncak-puncak (19).

Pada umumnya semua alat densitometer dilengkapi dengan sumber cahaya, sistem fokus, detektor peka cahaya, monokromator, dan filter optik yang selektif pada panjang gelombang tertentu. Sumber cahaya yang berbeda akan menyebabkan karakteristik spektrum yang berbeda pula. Lampu deuterium (D_2) dan lampu tungsten (W) adalah lampu yang sering digunakan sebagai sumber cahaya pada daerah UV. Untuk pengukuran zat yang berfluoresensi biasanya digunakan lampu merkuri (Hg) atau xenon (Xe). Lampu D_2 digunakan untuk analisis pada rentang panjang gelombang 190-450 nm, lampu W pada rentang 370-800 nm dan lampu Hg pada rentang 220-650 nm. Lampu D_2 dan W dapat digunakan bersamaan untuk analisis pada rentang panjang gelombang 190-800 nm (20).

F. VALIDASI METODE ANALISIS (12)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode diperlukan dalam suatu proses analisis untuk memastikan hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan. Suatu metode analisis perlu divalidasi apabila metode tersebut baru dikembangkan untuk suatu permasalahan yang khusus. Validasi juga dilakukan jika ada perbaikan dari metode yang sudah ada untuk memecahkan suatu permasalahan analisis yang baru. Selain itu juga proses validasi juga diperlukan jika diterapkan metode rutin pada laboratorium yang berbeda peralatannya dan jika dilakukan oleh analis yang berbeda pula. Seiring waktu, proses validasi metode juga perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode tersebut masih dapat dipercaya (12).

Parameter tersebut adalah kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektivitas (*specificity*), linieritas (*linearity*), rentang (*range*), batas kuantitasi (*LOQ*) dan batas deteksi (*LOD*).

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai hasil perolehan kembali dari analit yang ditambahkan. Syarat akurasi yang

baik adalah 98–102 %, sedangkan untuk sampel hayati (biologis / nabati) adalah $\pm 10 \%$ (12).

Akurasi suatu metode dapat ditentukan dengan cara yaitu:

a. Metode stimulasi (*spiked placebo recovery*)

Pada metode ini, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam matriks sampel (placebo). Hasil analisis dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya).

b. Metode penambahan baku (*standar addition method*)

Pada metode penambahan baku, sampel yang telah mengandung analit yang tidak diketahui kadarnya (blanko), dianalisis. Kemudian, sejumlah analit bahan murni yang diketahui kadarnya ditambahkan pada sampel yang telah mengandung analit namun tidak diketahui kuantitasnya. Selisih kedua hasil analisis dibandingkan dengan kadar sebenarnya (kadar analit yang ditambahkan) (21).

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien relatif). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*).

Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi $\leq 2\%$.

Rumus simpangan baku adalah :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) adalah :

$$KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

3. Selektivitas (*specificity*)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel.

Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) dari analisis sampel yang mengandung cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, atau senyawa asing lainnya dan dibandingkan dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Penyimpangan merupakan selisih dari hasil uji keduanya (21).

4. Linearitas (*linearity*) dan Rentang (*range*)

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematika yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit.

Rumus Simpangan Baku residual (S_y) adalah :

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_1 - \hat{y}_1)^2}{n-2}} \quad \text{dimana : } y_1 = a + b x$$

Standar Deviasi dari fungsi (S_{x_0}) adalah :

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

5. Batas Kuantitasi (LOQ) dan Batas Deteksi (LOD).

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Sedangkan Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas

deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang didapat dari percobaan (12).

Rumus Batas deteksi (LOD) dan Batas kuantitas (LOQ) adalah :

$$\text{LOD} = \frac{3(S_y/x)}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10(S_y/x)}{b}$$

Dimana :

S_y / x = Simpangan Baku/Deviasi

b = slope dari persamaan garis $y = a + bx$

BAB III

ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA

A. ALAT

Densitometer (*TLC Scanner 3 Camag*), alat penotol (*Camag Nanomat 4*), mikropipiler 2 μ l, Oven, komputer dilengkapi dengan program *Wincats*, bejana KLT (*CAMAG*), neraca analitik "O-Haus", peralatan gelas, pipet volume, masker, batu es, Spektrofotometri UV-Vis (*UV-1601, Shimadzu*), kuvet, pH-meter *Eutech instrument pH 510*, Pengaduk ultrasonik *Bronson 3200*, dan alat-alat gelas.

B. BAHAN

Sampel senyawa 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dari hasil sintesis Hayun dkk, 2009., silika gel 60 (*Merck*), lempeng KLT Silika 60 F₂₅₄ (*Merck*), aquadest (*Brataco*), metanol p.a, diklormetan p.a., kloroform p.a., toluen p.a., heksan p.a., etil asetat p.a. (*Merck*). kalium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida.

C. CARA KERJA

Penyiapan Bahan Percobaan

1. Pembuatan Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat 0,2 M

Ditimbang secara seksama lebih kurang 27,218 g kalium dihidrogen fosfat kemudian dilarutkan dengan aqua bebas karbondioksida mencapai volume 1000,0 ml.

2. Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 0,2 N

Ditimbang secara seksama lebih kurang 8,0 g natrium hidroksida kemudian dilarutkan dengan aqua bebas karbondioksida mencapai volume 1000,0 ml.

3. Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 0,1 N

Ditimbang secara seksama lebih kurang 4,0 g natrium hidroksida kemudian dilarutkan dengan aqua bebas karbondioksida mencapai volume 1000,0 ml.

4. Pembuatan Larutan Dapar pH 7,0

Kalium dihidrogen fosfat 0,2 M 50,0 ml dicampurkan dengan 29,1 ml natrium hidroksida 0,2 N dan diencerkan dengan aqua bebas karbondioksida P secukupnya mencapai volume 200,0 ml. Selanjutnya pH larutan dapar ini ditetapkan dengan pH-meter.

5. Optimasi Kondisi Analisis Secara KLT Densitometri

- a. Penetapan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan konsentrasi lebih kurang 10 ppm dalam pelarut metanol. Lalu dibuat kurva serapan dengan mengukur serapan larutan pada panjang gelombang 200-400 nm. Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum.

b. Optimasi pemilihan fase gerak

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan konsentrasi lebih kurang 100 ppm dalam pelarut metanol ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110⁰C selama 30 menit. Volume penotolan 2 μ L, dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah, jarak penotolan 1 cm dan dikembangkan sepanjang 9 cm. Kemudian lempeng dielusi menggunakan fase gerak sebagai berikut :

1. kloroform : metanol (9,5:0,5)
2. kloroform : metanol (8,5:1,5)
3. diklormetan : metanol (9:1)
4. diklormetan : metanol (9,5:0,5)
5. diklormetan : etilasetat (5:5)
6. toluen : etilasetat (9:1)
7. etil asetat : heksan (5:5)
8. etil asetat : heksan (7:3)

Setelah pengembangan selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC Scanner*. Eluen yang memberikan hasil

pemisahan baik akan digunakan pada pemeriksaan kromatografi selanjutnya.

c. Pemilihan panjang gelombang optimum menggunakan *TLC Scanner*

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan konsentrasi lebih kurang 100 ppm, ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110⁰C selama 30 menit. Dengan volume penotolan 2 µL, dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, jarak penotolan 1 cm dan dikembangkan dengan jarak elusi 9 cm, dengan fase gerak terpilih.

Setelah pengembangan selesai, bercak pada lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC Scanner*. Lalu dibuat kurva serapannya pada panjang gelombang yang diperoleh pada percobaan a, Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum.

6. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Pengujian Linearitas

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dalam pelarut metanol dibuat dengan konsentrasi 30; 40; 50; 60; 80; dan 90 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110⁰C selama 30 menit. Volume penotolan sebanyak 2 µL dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, jarak penotolan 1 cm dan dikembangkan sepanjang 9 cm dengan fase gerak terpilih.

Setelah pengembangan selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC Scanner* pada panjang gelombang maksimum. Diperoleh luas puncak (area), lalu dibuat kurva kalibrasi perbandingan antara luas puncak (area) dengan berat bercak sehingga didapat persamaan garis linier $y = a + bx$.

7. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dari 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat dihitung dengan perhitungan statistik melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh

8. Uji Keterulangan

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dalam pelarut metanol dibuat dengan konsentrasi 30, 60 dan 90 ppm. Masing-masing konsentrasi sejumlah masing-masing enam titik totolan ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110°C selama 30 menit. Volume penotolan 2 μl dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah, jarak penotolan 1 cm dan dikembangkan sepanjang 9 cm pada kondisi analisis terpilih.

Setelah pengembangan selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dicatat luas puncak yang diperoleh untuk menghitung koefisien variasinya.

Parameter keterulangan ditentukan dengan menghitung simpangan baku dan koefisien variasinya. Metode dianggap memiliki keterulangan yang baik jika koefisien variasi kurang dari atau sama dengan 2%.

9. Uji Selektivitas

a. Larutan uji

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 600 ppm.

b. Larutan basa

Larutan uji 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon 1,0 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, ditambah NaOH 0,1 N sebanyak 2,0 ml dipanaskan di atas waterbath pada suhu lebih kurang 100⁰C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu kamar. Setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml, dan ditambahkan metanol hingga batas, kemudian larutan ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110⁰C selama 30 menit. Volume penotolan 2 µL dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah, jarak penotolan 1 cm, dan dikembangkan sepanjang 9 cm pada kondisi analisis terpilih.

Setelah pengembangan selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum.

10. Uji Stabilitas 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon

Ditimbang secara seksama lebih kurang 15,0 mg 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon, kemudian dimasukan ke dalam labu ukur 25,0 ml dilarutkan dengan metanol, dan dicukupkan hingga batas, sehingga diperoleh konsentrasi 600 ppm. Larutan ini dipipet 1,0 ml, dimasukkan ke dalam vial percobaan yang telah dikalibrasi (72 vial, 1 ml/vial). Masing-masing ditambah 3,0 ml larutan dapar pH 7,0 atau 10,0. Lalu setiap kelompok pH, dibagi menjadi tiga kondisi yaitu untuk percobaan pada suhu $50^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, dan $70^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pemanasan sampel dilakukan dalam oven. Pemanasan oven baru dimulai setelah sampel masuk oven. Setelah oven mencapai suhu percobaan, satu sampel diambil dan ditentukan kadarnya sebagai data percobaan pada t_0 . Waktu pengambilan dapat dilihat pada Tabel 1. Sampel yang lain diambil setelah periode waktu tertentu diperhitungkan setelah t_0 . Setelah waktu pemanasan dicapai sampel diambil dan didinginkan di atas batu es untuk menghentikan penguraian, ditambahkan metanol ke dalam vial percobaan yang telah dikalibrasi ad batas, lalu segera ditentukan kadarnya dengan *TLC Scanner*. Larutan ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 110°C selama 30 menit. Volume penotolan 2 μL titik penotolan 1 cm dari tepi bawah, jarak

penotolan 1 cm, kemudian dikembangkan sepanjang 9 cm dengan kondisi analisis terpilih.

Tabel. 1

Uji stabilitas dipercepat senyawa 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon dalam larutan pH 7,0; dan 10,0

Waktu t (jam)	pH 7,0			pH 10,0		
	50°C	60°C	70°C	50°C	60°C	70°C
0						
4						
8						
12						
24						
48						

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Penetapan Panjang Gelombang maksimum dengan Spektrofotometri UV-Vis.

Larutan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan konsentrasi 10 ppm dalam pelarut metanol memberikan panjang gelombang maksimum pada 323,5 nm, dimana memberikan absorpsi maksimum yaitu 0,711 AU. Gambar spektrum serapan dari 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo-heksanon dapat dilihat pada Gambar 6.

2. Pemilihan Fase Gerak

Fase gerak yang terpilih yaitu diklormetan : metanol (9:1) diantara delapan macam fase gerak lainnya. Data mengenai fase gerak dan Rf dapat dilihat pada Tabel 2 dan gambar kurva densitas fase gerak dapat dilihat pada Gambar 7a-7h.

3. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan *TLC Scanner*.

Panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum adalah 334 nm. Gambar spektrum serapan dari 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat dilihat pada Gambar 8.

4. Pembuatan Kurva Kalibrasi 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon.

Diperoleh persamaan regresi linier kurva kalibrasi yaitu $y = 1157,3121 + 19,4282x$ dimana y adalah luas puncak 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dan x adalah berat atau kandungan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon (ng) dan nilai regresi linier (r) yaitu 0,9975. Data kurva kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat dilihat pada Tabel 3. Kurva densitas kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 10a-10f dan persamaan garis regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat dilihat pada Gambar 9.

5. Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon berturut-turut adalah 11.8086 ppm dan 39.3619 ppm. Data perhitungan batas deteksi dan batas kuantitas dapat dilihat pada Tabel 4.

6. Uji Keterulangan

Hasil dari uji keterulangan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon mempunyai nilai koefisien korelasi kurang dari 2 %. Data uji keterulangan dapat dilihat pada Tabel 5.

7. Uji Selektivitas

Hasil kurva densitas dari uji selektivitas 2,6-bis(4-sulfonamido-benzilidena)sikloheksanon terdapat pada Gambar 11.

8. Uji Stabilitas

Hasil dari uji stabilitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon mengikuti orde 1. Pada pH 7,0 suhu 25⁰C memiliki $k_1 = 0,13 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 17,6 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,80 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 5,3 jam. Sedangkan pada pH 10,0 suhu 25⁰C memiliki $k_1 = 7,01 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 1,14 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,02 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 0,10 jam. Hasil uji stabilitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon pada tiap suhu dapat dilihat pada Tabel 6a-6b.

B. PEMBAHASAN

Uji stabilitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Densitometri, dimulai dengan menentukan panjang gelombang maksimum, untuk deteksi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat dideteksi dengan

menggunakan Spektrofotometri UV-Vis karena memiliki gugus kromofor. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm dalam pelarut metanol. Serapan maksimum 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon adalah pada panjang gelombang 323,5 nm.

Setelah diperoleh panjang gelombang maksimum untuk analisis, selanjutnya dilakukan pemilihan fase gerak yang terbaik. Terdapat delapan macam fase gerak yang dilakukan. Setelah dilakukan uji fase gerak, dipilih fase gerak yang memberikan pemisahan yang baik dan nilai Rf antara 0,2-0,8. Diantaranya kloroform : metanol (9,5:0,5), hasil dari fase gerak ini didapatkan belum memperlihatkan pemisahan dan nilai Rf yang baik untuk analisis kuantitatif yaitu 0,11 Rf. Sehingga kombinasi tersebut diubah perbandingannya menjadi kloroform : metanol (8,5:1,5), fase gerak ini didapatkan nilai Rf 0,72 namun pemisahannya kurang baik.

Selanjutnya dicobakan kombinasi pelarut lain. Dari beberapa fase gerak yang dicoba ternyata hanya fase gerak diklormetan: metanol yang memberikan hasil yang baik. Fase gerak kombinasi diklormetan : metanol (9:1), dan diklormetan : metanol (9,5:0,5), memberikan nilai Rf berturut-turut 0,56 dan 0,30. Fase gerak yang dipilih untuk analisis adalah diklormetan : metanol (9:1), kurva densitas fase gerak dapat dilihat pada Gambar 7a-7h.

Lempeng yang digunakan adalah lempeng KLT siap pakai silika gel 60 F₂₅₄, Merck). Lempeng tersebut bersifat polar sehingga digunakan fase gerak yang bersifat non polar, maka metode yang dilakukan adalah KLT fase normal. Lempeng diaktifkan dengan pemanasan 100⁰C selama 30 menit. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan uap air yang mungkin ada dalam penyimpanan. Adanya uap air dalam lempeng akan menambah polaritas dari lempeng sehingga mempengaruhi hasil kromatografi.

Penotolan menggunakan mikrokapiler (2 µl), dengan menggunakan alat penotol (Camag Nanomat 4). Tahap penotolan merupakan bagian yang dapat memberikan faktor kesalahan dalam analisis kuantitatif pada metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). sehingga akan membuat hasil analisis menjadi tidak akurat. Oleh karena itu pengambilan larutan yang akan ditotol harus dilakukan secara kuantitatif yaitu mengisi mikrokapiler dengan larutan tersebut sampai mikrokapiler terisi penuh. Lempeng hasil elusi dianalisis dengan densitometer (Camag, *TLC Scanner 3*). Pengukuran menggunakan mode absorpsi karena senyawa 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)siklo-heksanon memiliki gugus kromofor. Sumber cahaya yang digunakan adalah lampu D₂ (190-450 nm).

Pada pengukuran awal dengan *TLC Scanner*, bercak diukur pada panjang gelombang 323 nm yang diperoleh dari Spektrofotometri UV-Vis, namun setelah pengukuran spektrum serapan bercak 2,6-bis(4-

sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dengan fase gerak yang baik menggunakan *TLC Scanner*, ternyata panjang gelombang maksimum bercak 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon terletak pada panjang gelombang 334 nm, dapat dilihat pada Gambar 8. Sehingga untuk selanjutnya analisis 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Panjang gelombang ini dipilih sebagai panjang gelombang maksimum dimana 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon dapat memberikan serapan maksimum.

Setelah mendapat kondisi optimum untuk analisis, tahap selanjutnya adalah validasi metode. Validasi perlu dilakukan karena metode ini merupakan metode analisis yang baru. Parameter-parameter validasi yang diukur adalah linieritas, presisi dan selektivitas. Kurva kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon yang terdiri dari enam konsentrasi dengan rentang 60-200 ng. Dengan diketahui konsentrasi dan luas puncak yang diperoleh, maka dapat dihitung persamaan garis linier $y = 19.4282x + 1157.3121$ nilai $r = 0.9975$. Setelah itu, dilakukan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dari persamaan kurva kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon. Batas deteksi 11,8086 ppm dan batas kuantitasi 39.3619 ppm dapat dilihat pada Tabel 4.

Uji validasi berikutnya adalah uji keterulangan. Uji ini dilakukan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Masing konsentrasi

ditotolkan sebanyak enam kali. Setiap konsentrasi yang diuji keterulungannya tersebut menghasilkan koefisien variasi yang baik yaitu dibawah 2 %. Hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Gambar 11. Kurva densitas menunjukkan adanya 2 puncak yang terpisah, puncak yang besar dianggap 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon sedangkan puncak yang kecil menunjukkan hasil degradasinya. Hal ini dilihat dari kesamaan Rf nya.

Data hasil uji stabilitas dapat dilihat pada Tabel 6a-6b. Untuk menentukan orde reaksi dari degradasi zat uji dilakukan regresi linier hubungan antara kandungan per bercak (C) terhadap waktu, serta hubungan $\ln C$ terhadap waktu, untuk setiap pH dan suhu percobaan. Hasil analisis regresi linier tersebut dapat dilihat pada Tabel 7a-7b. Dari tabel ini menunjukkan bahwa koefisien korelasi (r) hubungan antara $\ln C$ terhadap waktu lebih linier dibandingkan koefisien korelasi (r) hubungan antara C terhadap waktu. Dengan demikian reaksi degradasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon mengikuti persamaan orde 1. Tetapan kecepatan degradasi (k) orde 1 pada tiap suhu adalah slope dari persamaan regresi linier hubungan antara $\ln C$ terhadap waktu. Besarnya tetapan kecepatan degradasi (k) pada pH 7,0 dan pH 10,0 dapat dilihat pada Tabel 7a-7b. Untuk mendapatkan k_1 pada suhu 25⁰C diperoleh dengan melakukan analisis regresi linier hubungan $\log k_1$ dengan 1/T, hasil analisis hubungan $\log k_1$ dengan 1/T dapat dilihat pada Tabel 8a-8b. Dari hasil analisis tersebut diperoleh persamaan : $\text{Log } k_1 =$

- $3853,6986 \cdot 1/T + 12,0483$ untuk pH 7,0 dan $\text{Log } k_1 = -249,3795 \cdot 1/T + 1,6828$ untuk pH 10,0. Kurva regresi linier $\log k_1$ terhadap $1/T$ dapat dilihat pada Gambar 13a-13b. Dengan persamaan tersebut dapat dihitung besarnya k_1 pada suhu 25°C (suhu kamar), E_a (energi aktivasi), *shelf life* atau waktu kadaluarsanya, serta waktu paronya, hasil perhitungan adalah sebagai berikut : Pada pH 7,0 suhu 25°C memiliki $k_1 = 0,13 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = $17,67 \text{ kkal mol}^{-1}$, *shelf life* (t_{90}) = 0,80 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 5,30 jam. Sedangkan pada pH 10,0 suhu 25°C memiliki $k_1 = 7,01 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = $1,14 \text{ kkal mol}^{-1}$, *shelf life* (t_{90}) = 0,02 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 0,10 jam.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum untuk analisis 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri dengan menggunakan fase diam yaitu lempeng silica gel F₂₅₄ dan fase gerak diklormetan : metanol (9:1) pada panjang gelombang maksimum 334 nm.
2. Batas deteksi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon adalah 11.8086 ppm dan batas kuantitasi adalah 39.3619 ppm. Nilai dari koefisien variasi kurang dari 2 %.
3. Hasil dari stabilitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon pada suhu 25⁰C pH 7,0 memiliki $k_1 = 0,13 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 17,67 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,80 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 5,30 jam. Sedangkan pada pH 10,0 suhu 25⁰C memiliki $k_1 = 7,01 \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 1,14 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 0,02 jam dan waktu paro ($t_{1/2}$) = 0,10 jam. Dari data diatas dapat diambil kesimpulan bahwa pH 7,0 lebih stabil dibandingkan dengan pH 10,0.

B. SARAN

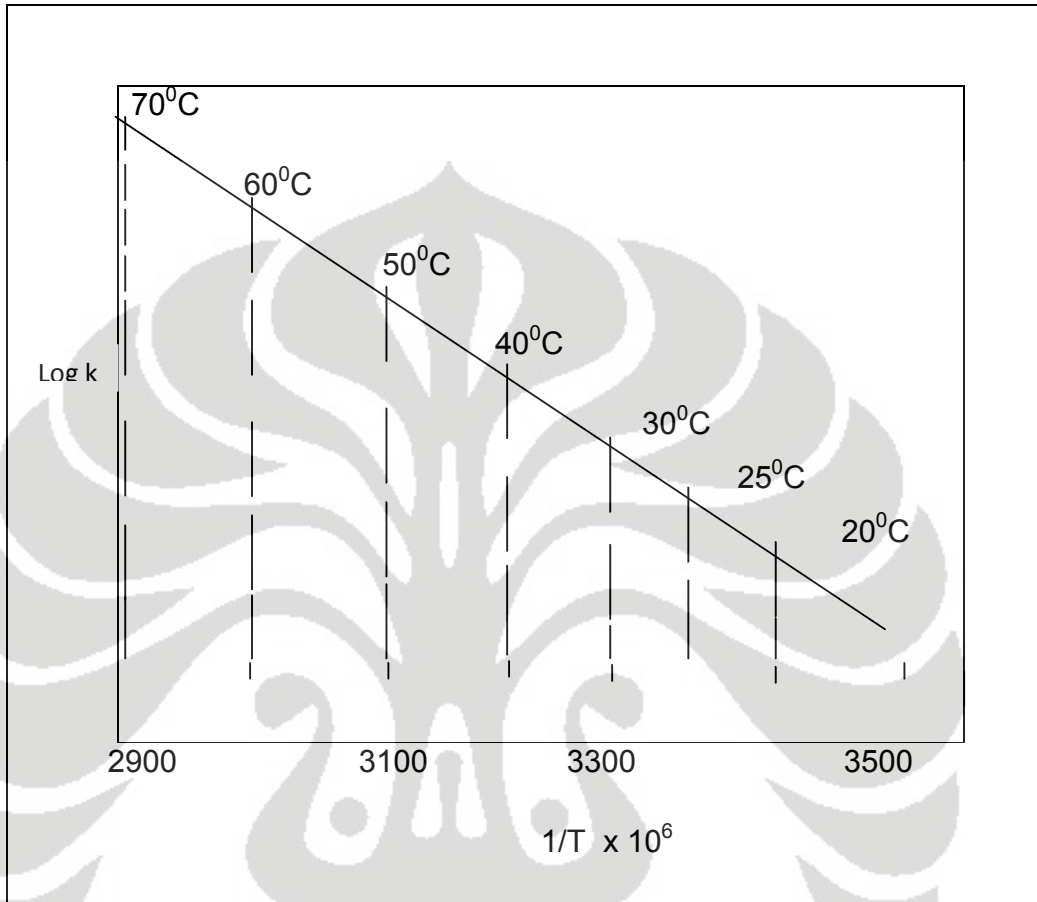
Disarankan untuk penelitian selanjutnya dilakukan dengan meneliti uji stabilitas dipercepat 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.



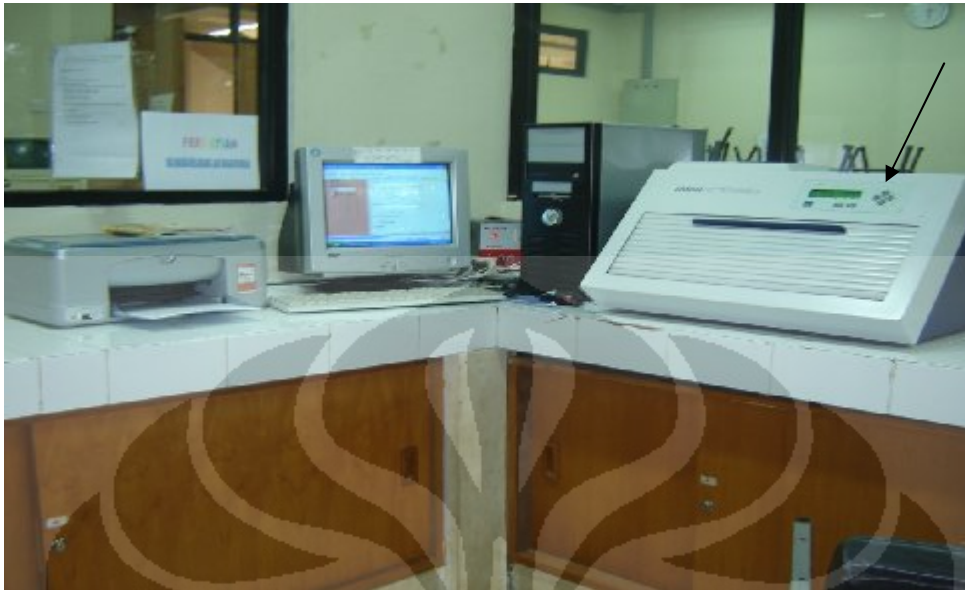
DAFTAR ACUAN

1. Hayun, *et al.*, *Sintesis dan Uji Aktivitas Antiinflamasi 2,6-Bis(4-Sulfonamidobenzilidena)Sikloheksanon* Laporan Penelitian Hibah SETILA. FMIPA. Universitas Indonesia. Depok. 2009.
2. Hayun. Hubungan Lipofilisitas-Aktivitas Koleritika Siklovalon dan Analognya "Thesis" Pascasarjana UGM. Yogyakarta. 1995.
3. Nurrochmad, A, Supardjan, A.M., and Sardjiman. Penghambatan Siklooksigenase oleh Siklovalon dan Tiga Senyawa Analognya. *Majalah Farmasi Indonesia*, **9 (4)**, hlm.180-185. 1998.
4. Oetari, R.A., dan Yuwono, T., Stabilitas PGV-0 (Pentagamavunon-0) sebagai Obat Antiinflamasi dalam bentuk sediaan larutan Cair, *Majalah Farmasi Indonesia Universitas Gajah Mada*, **15 (1)**, hlm. 1-24. 2004.
5. Martin, *et al.*, *Farmasi Fisik ed. 3* diterjemahkan dari *physical Pharmacy*, oleh Yoshita. Jakarta : UI Press. Hlm.724-826. 1993.
6. *Pemastian Mutu Obat*. <http://books.google.co.id> diunduh pada tanggal 14 Januari 2009. Pukul 08:11 WIB.
7. Martin E. W. *Remington Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Company. hlm.1425-1433. 1961.
8. Connors, K.A., Amidon, G.L., dan Stella, V.J., *Stabilitas Kimia Sediaan Farmasi. ed. 1* diterjemahkan dari *Chemical Stability of Pharmaceuticals* oleh Didik G. IKIP Semarang Press. 1992.
9. Anonim. *Sintesis PGV-0 Dengan Katalis Asam dan Pengembangan Analisis Kemurnian Dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*. <http://eprints.ums.ac.id> diunduh pada tanggal 14 Januari 2009. Pukul 17:18
10. Anonim. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm. 1002. 1995.
11. Touchstone, J.C; Dobbins M.F.*Practice of Thin Layer Chromatography. 2nd edition*. New York : John Wiley & Sons, Inc. 1983.

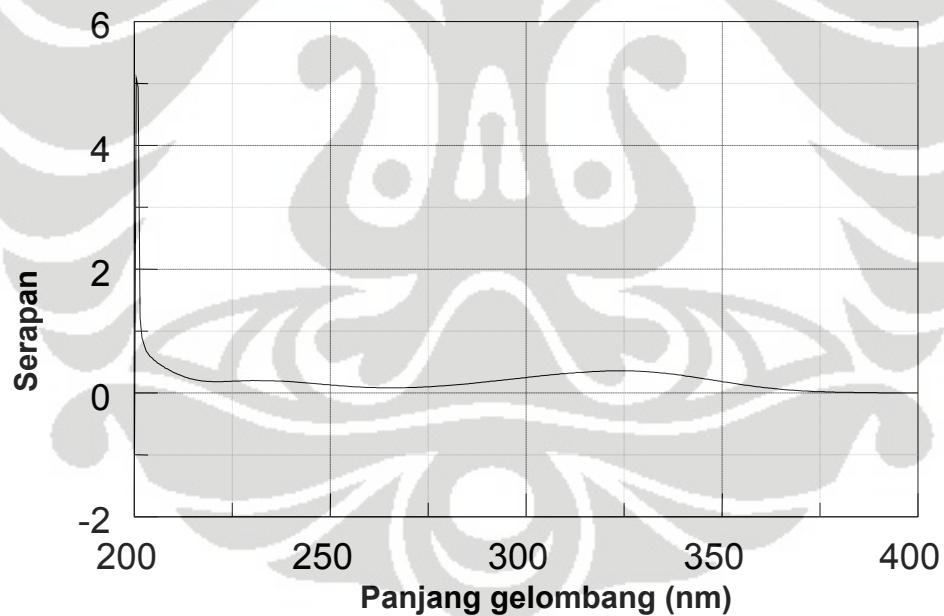
12. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Cetakan pertama. Departemen Farmasi FMIPA. Universitas Indonesia. Jakarta. hlm. 205,101, 144-161. 2006.
13. Gruenwede, D.W; John, R.W. *Food Analysis, principles and Techniques Volume 4 Separation Techniques*. USA : marcel Dekker, inc. 1987.
14. Touchstone, J.C; Dexter, R. *Thin Layer Chromatography: Quantitative Enviromental & Clinical Applications*. New York : John Wiley & Sons, Inc.1976.
15. Gritter, RJ, Bobbit JM & Swarting AE. *Pengantar Kromatografi edisi 2*. Terj. dari *Introduction to chromatography* oleh Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB, hlm. 90. 1991.
16. Sherma, J; Fried, B. *Detection, Identification, and Documentation*. Dalam: *Handbook of Thin Layer Chromatography 2nd Edition, Revised and Expanded, Vol 71 Chapter 29*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996.
17. Poole. C.F; Khatib, S. *Quantitative Thin Layer Chromatography*. Dalam : Katz E. *Quantitative Analysis Using Chromatographic Techniques*, Chapter 6. Norwalk: John Wiley & Sons, Ltd.1987.
18. Indrayanto, Gunawan dan Yuwono, Mochammad. *Validation of TLC Analyses*. Airlangga University, Surabaya, Indonesia. *Encyclopedia of Chromtography*. Diterjemahkan oleh Marcel Dekker, Inc.2003.
19. Toouchstone J.C dan Sherma J. *Densitometry in Thin Layer Chromatography Practise and Applications*. New York : John Wiley & Sons, Inc. 1979.
20. Anonym. The Camag TLC scanner 3. <http://www.lenchrom.spb>, diunduh pada tanggal 5 mei 2009. Pkl.14.55.
21. Harmita. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Pehitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian 1(3), hlm. 117 - 135. Depok : Departemen Farmasi FMIPA-UI. Desember 2004.
22. Anonim. *Farmakope Indonesia edisi III*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hlm 743-755. 1979.



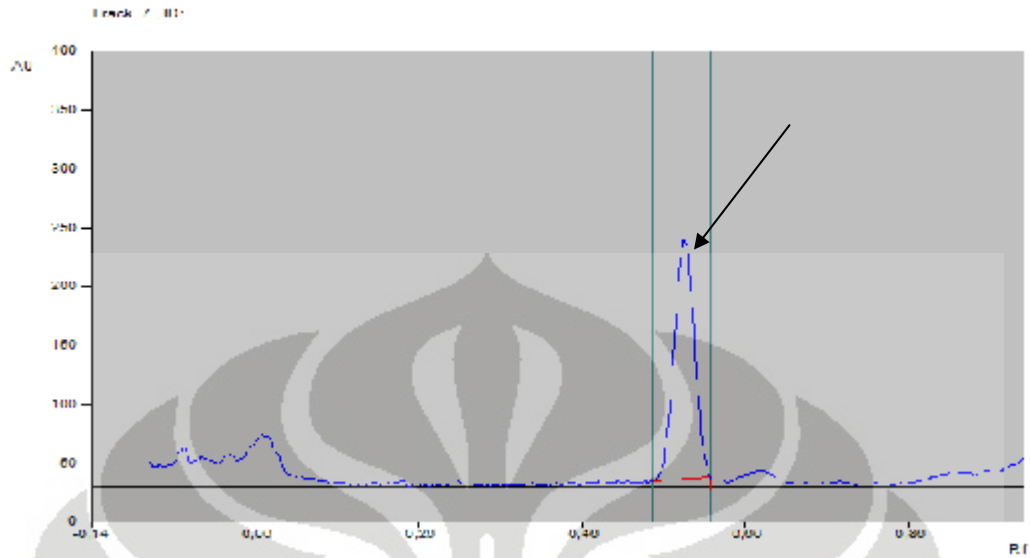
Gambar 2. Kurva Arrhenius untuk memperkirakan kestabilan bat pada suhu kamar.



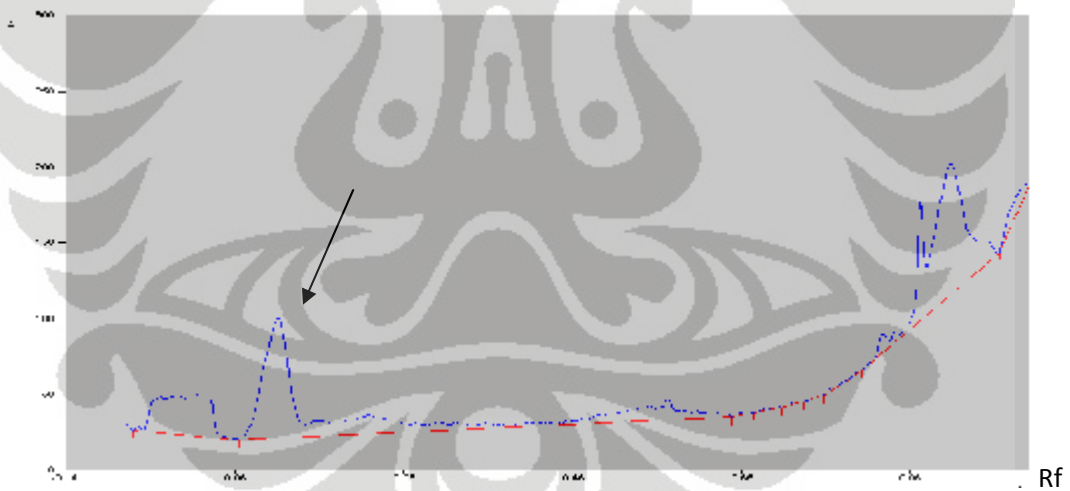
Gambar 5. Alat TLC Scanner dan komputer yang dilengkapi dengan program *wincats*



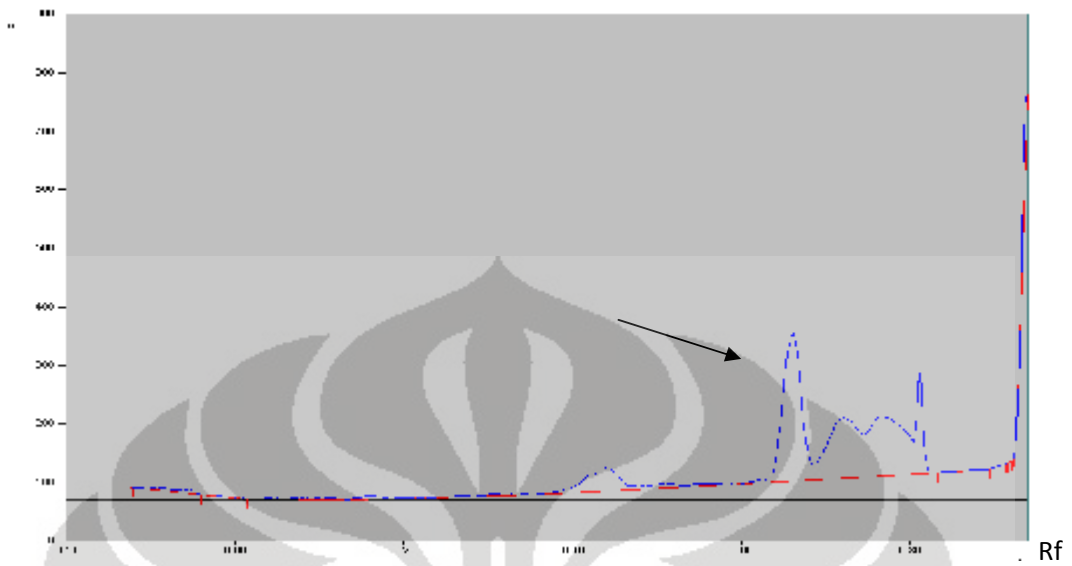
Gambar 6. Kurva serapan 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 10 ppm dalam pelarut metanol pada panjang gelombang 200-400 nm.



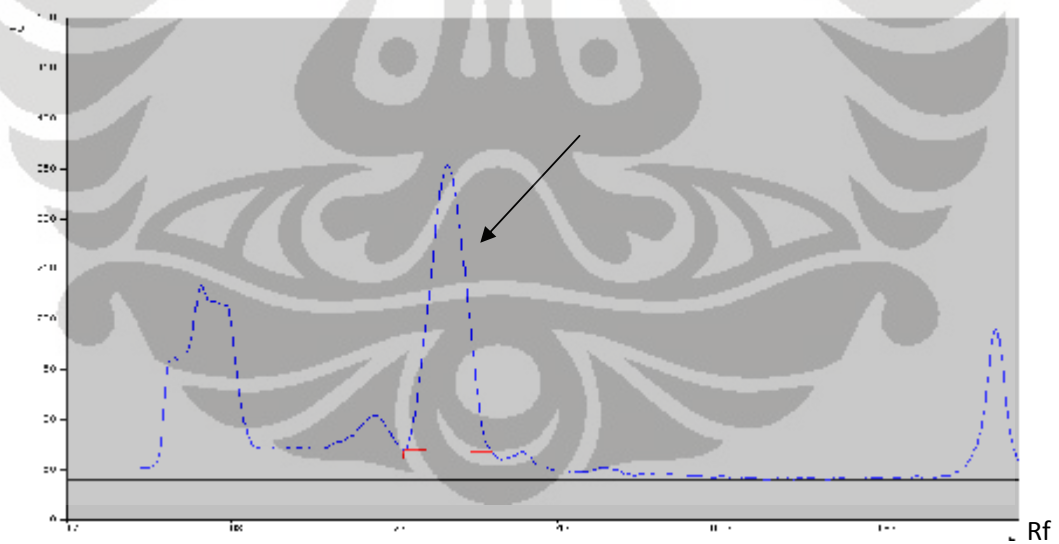
Gambar 7a. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak terpilih diklorometan : metanol (9:1).



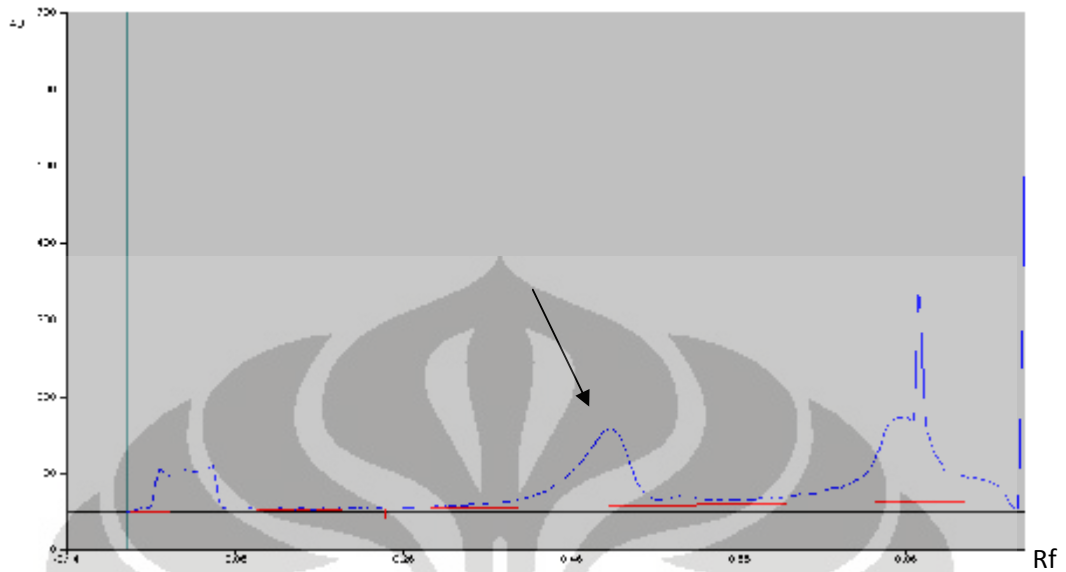
Gambar 7b. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak kloroform:metanol(9,5:0,5)



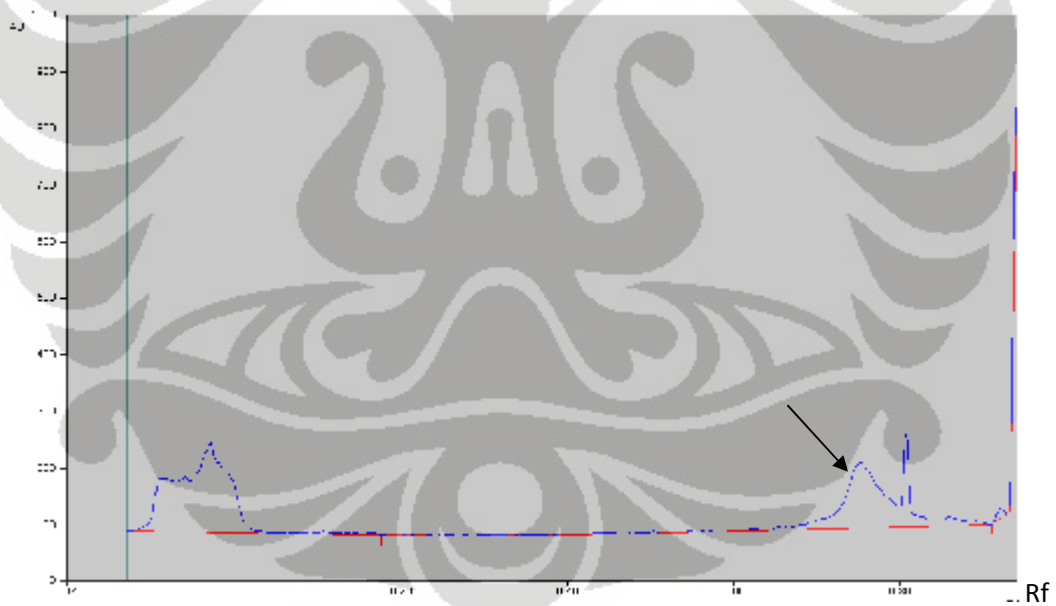
Gambar 7c. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak kloroform:metanol(8,5:1,5).



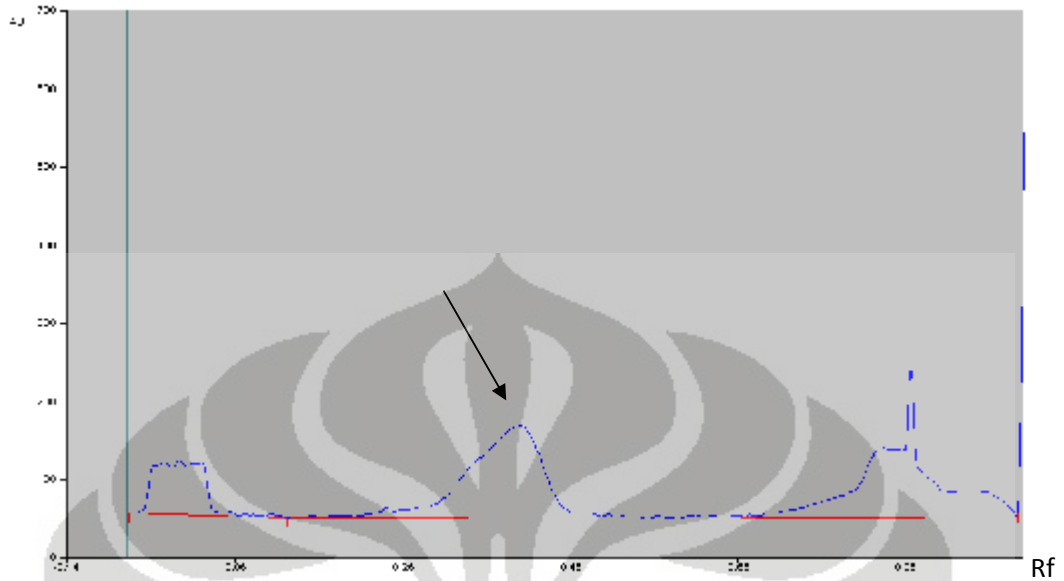
Gambar 7d. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak diklormetan :metanol (9,5:0,5)



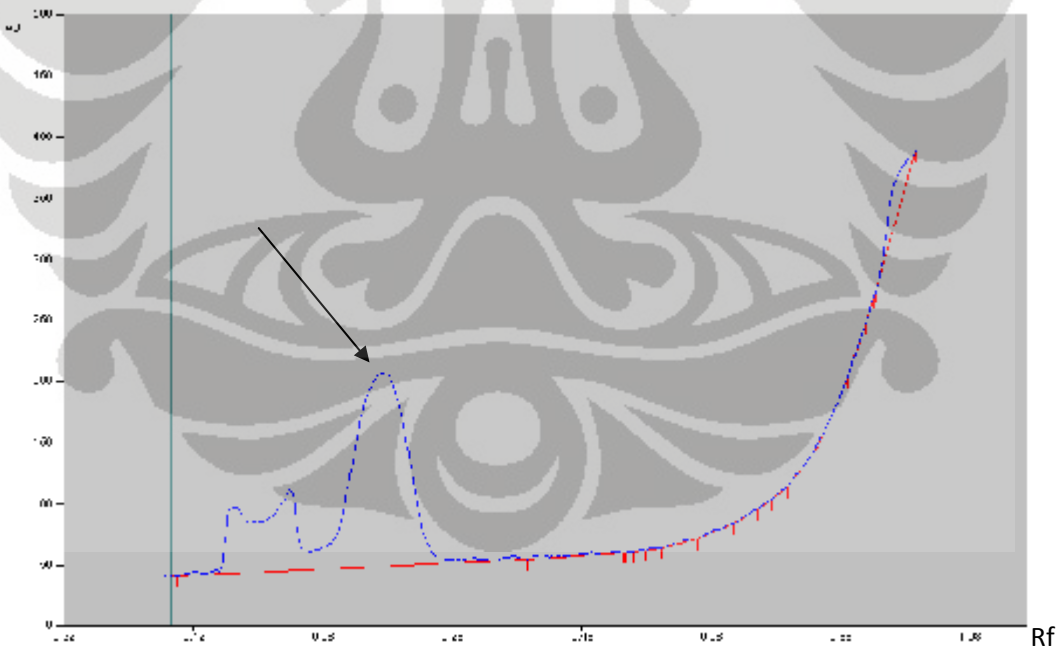
Gambar 7e. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak diklormetan : etil asetat (5:5).



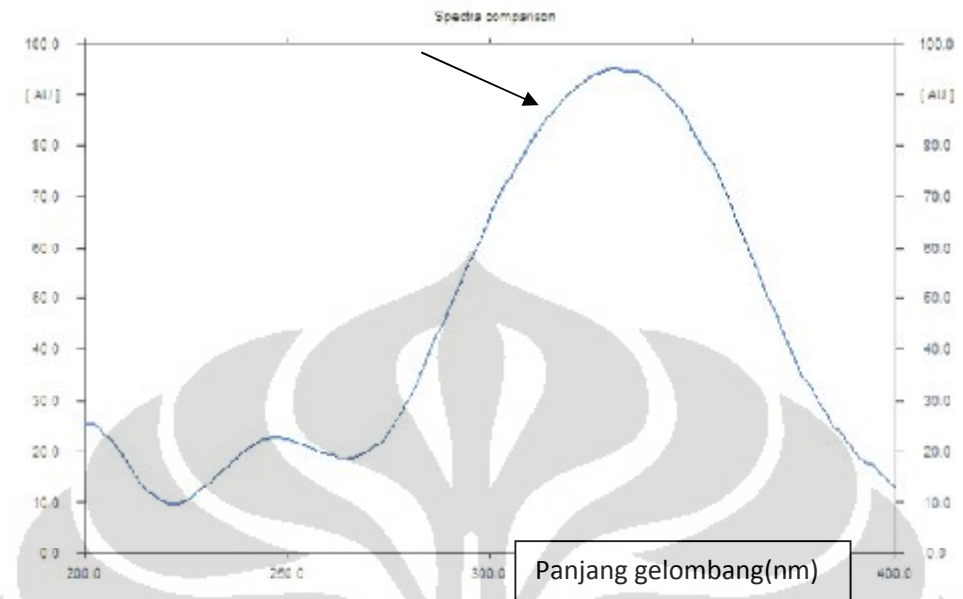
Gambar 7f. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak etil asetat : heksan (5:5).



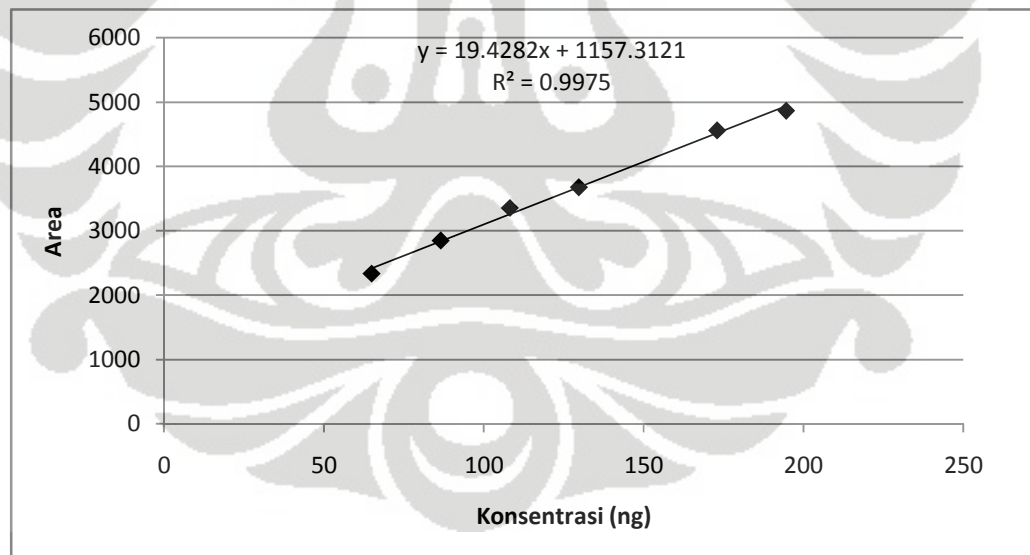
Gambar 7g. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak etil asetat : heksan (7:3)



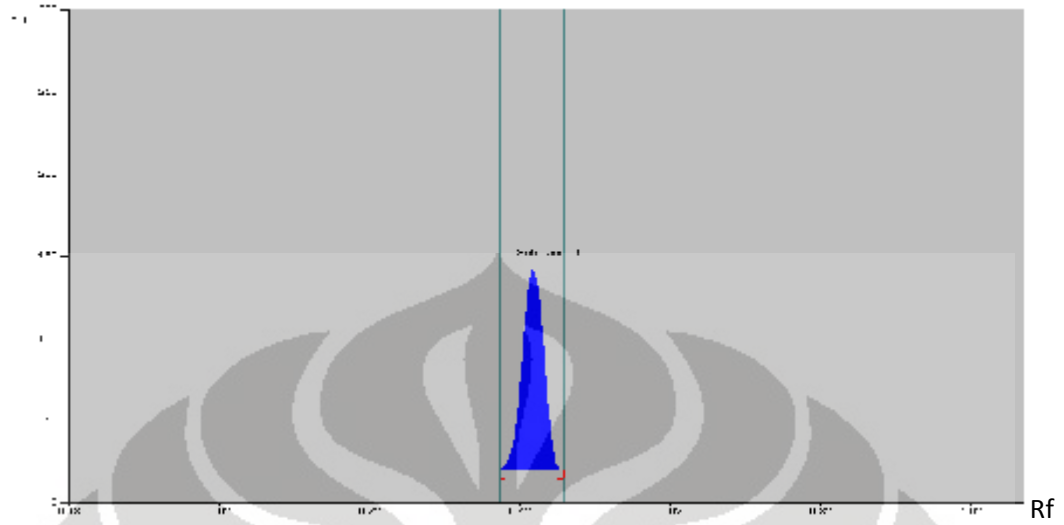
Gambar 7h. Kurva densitas 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 100 ppm dengan fase gerak toluen : etil asetat (9:1).



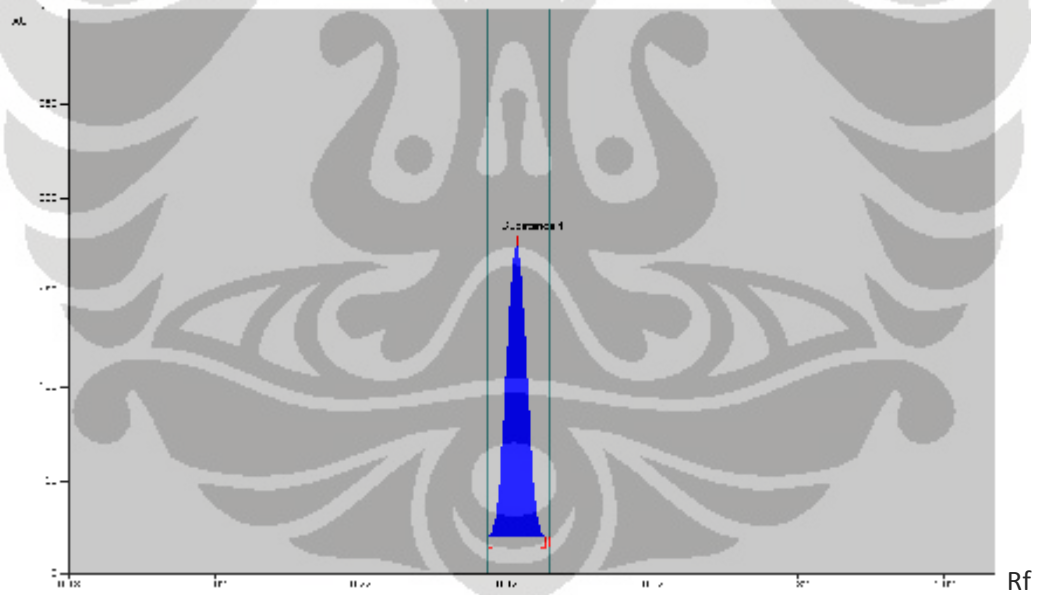
Gambar 8. Kurva serapan bercak 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pada panjang gelombang 334 nm dengan *TLC Scanner*



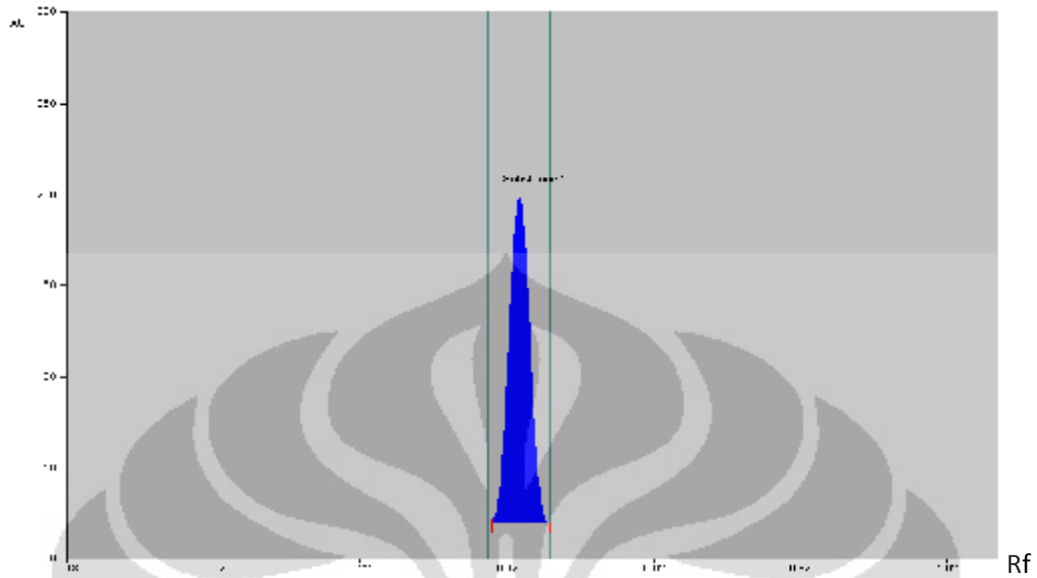
Gambar 9. Kurva kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon



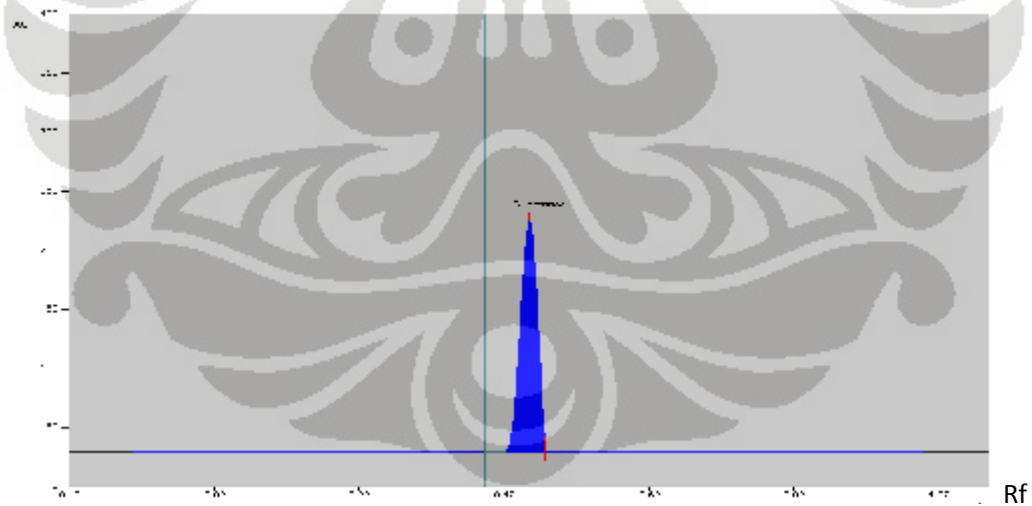
Gambar 10a. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 64,87 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada 334 nm



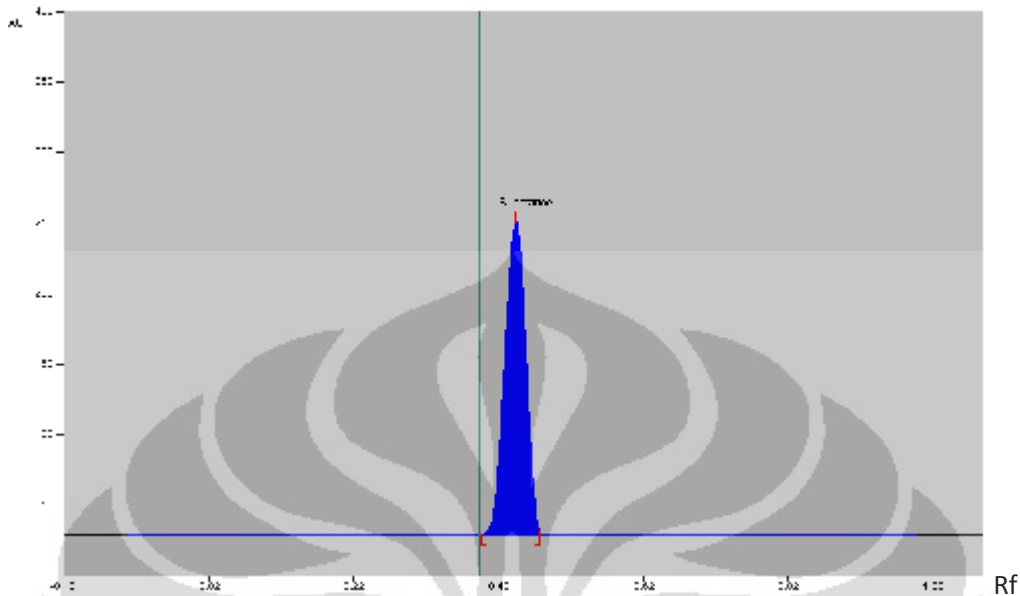
Gambar 10b. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 86,49 ng dengan fase gerak diklormetan:Metanol (9:1) pada 334 nm.



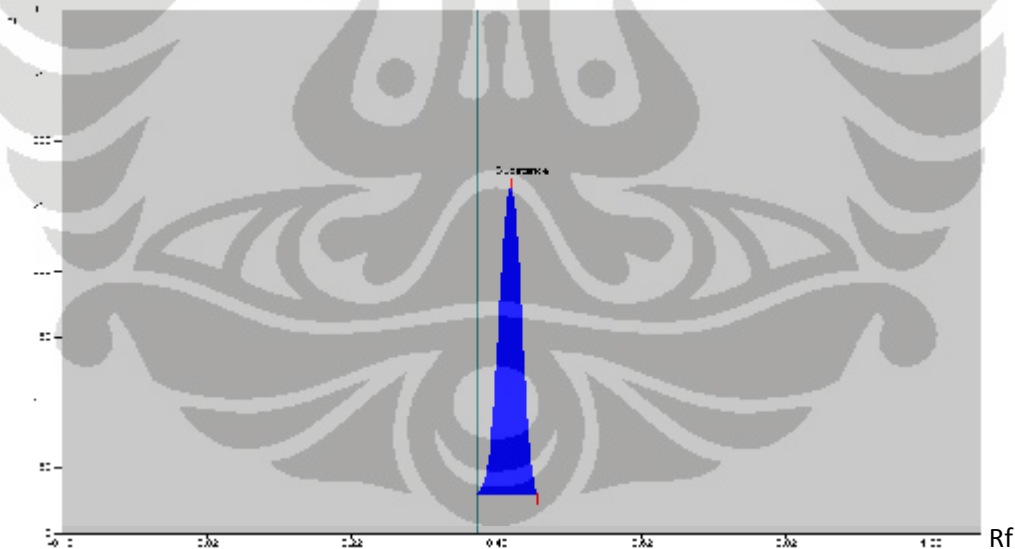
Gambar 10c. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 108,11 ng dengan fase gerak diklormetan:Metanol (9:1) pada 334 nm.



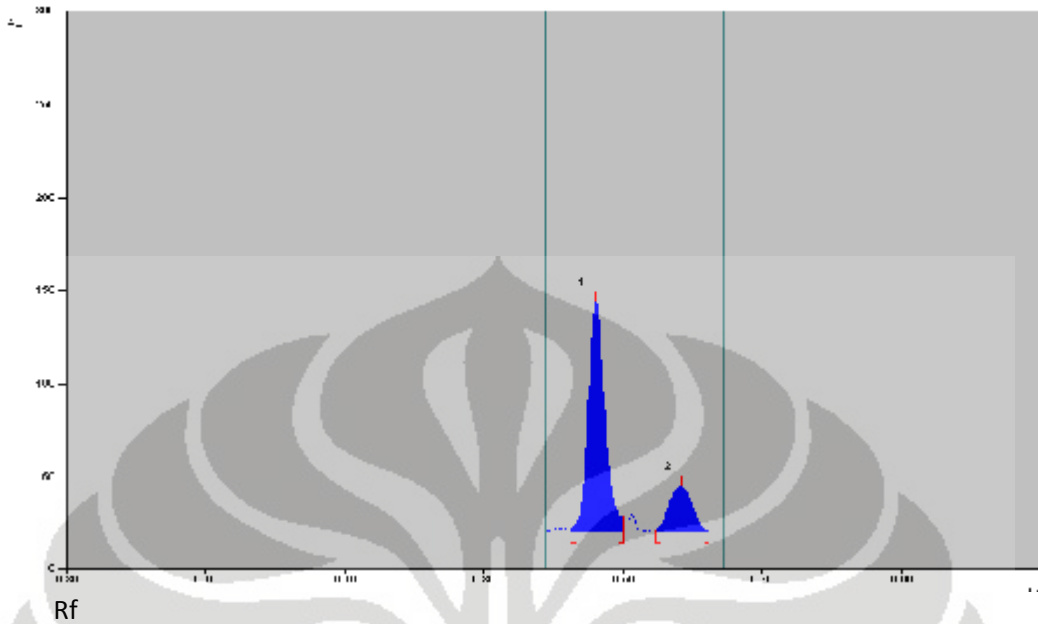
Gambar 10d. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 129,74 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada 334 nm.



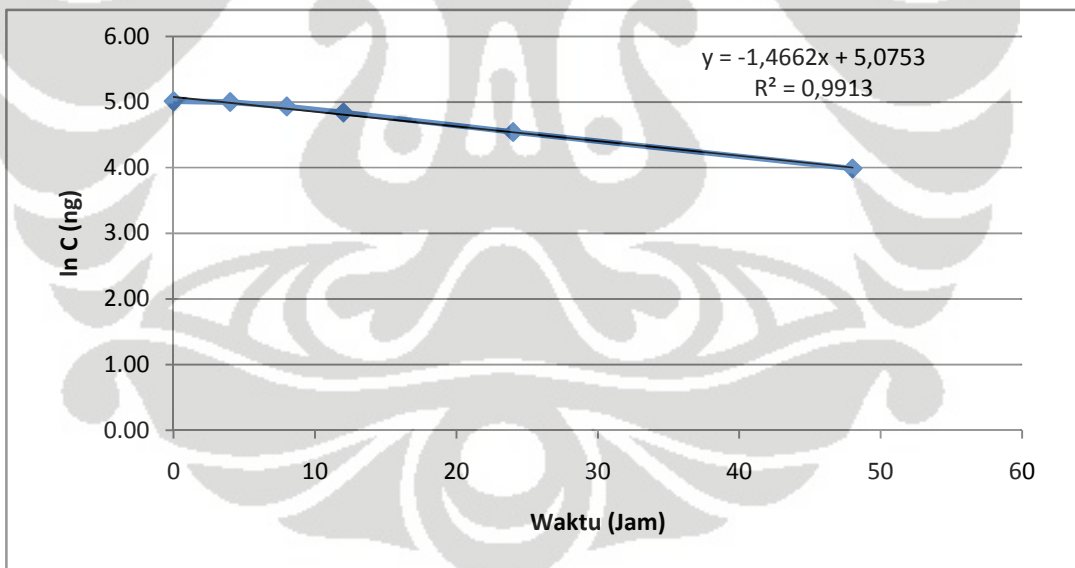
Gambar 10e. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-Sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 172,98 ng dengan fase gerak diklormetan:etanol (9:1) pada 334 nm.



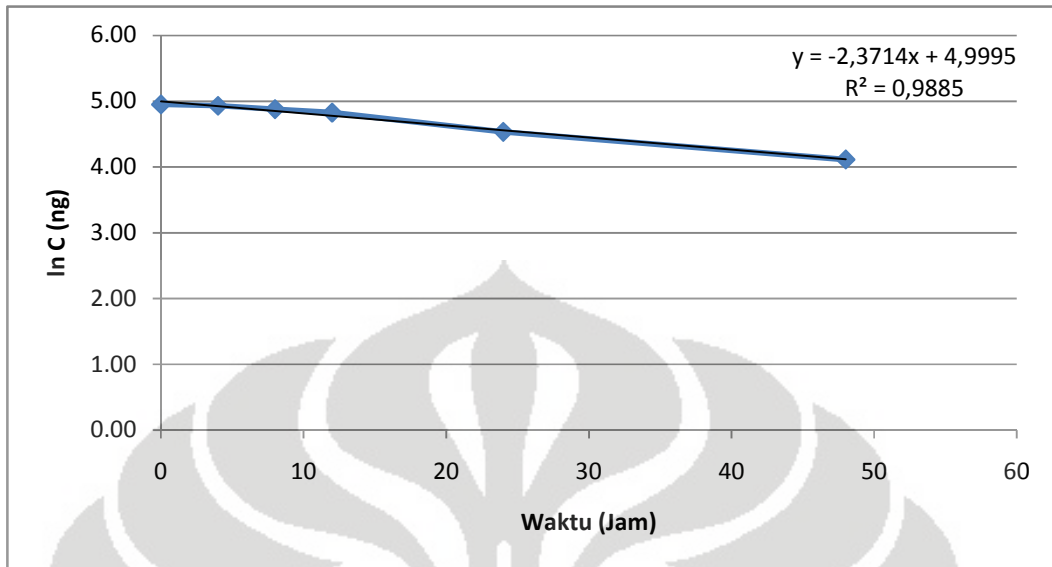
Gambar 10f. Kurva densitas kalibrasi 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon 194,61 ng dengan fase gerak diklormetan:metanol (9:1) pada 334 nm.



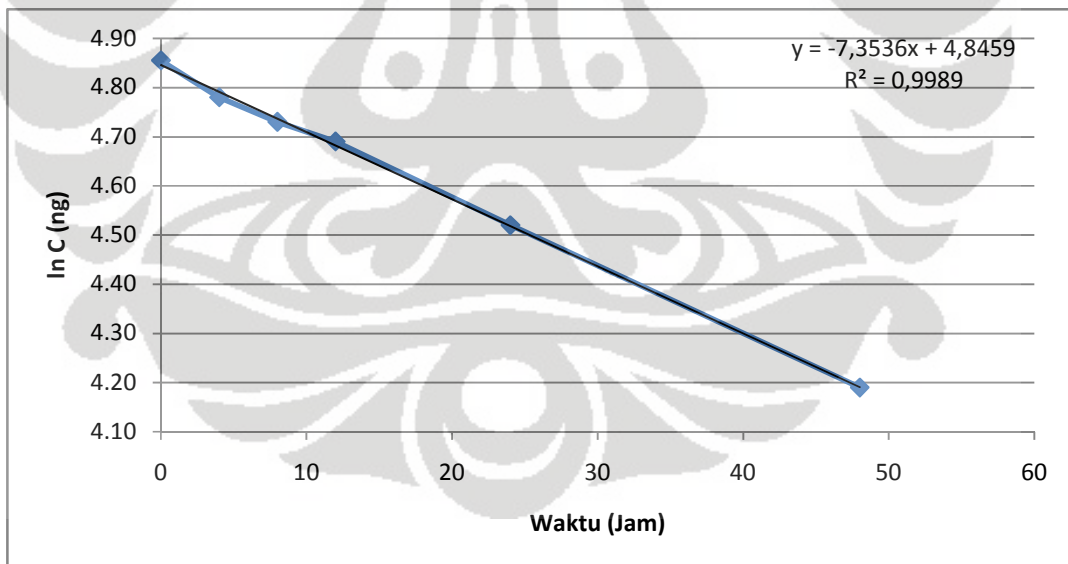
Gambar 11. Kurva densitas selektivitas 2,6-bis(4-sulfonamido-benzilidena)sikloheksanon dengan fase gerak diklorometan:metanol (9:1) pada 334 nm.



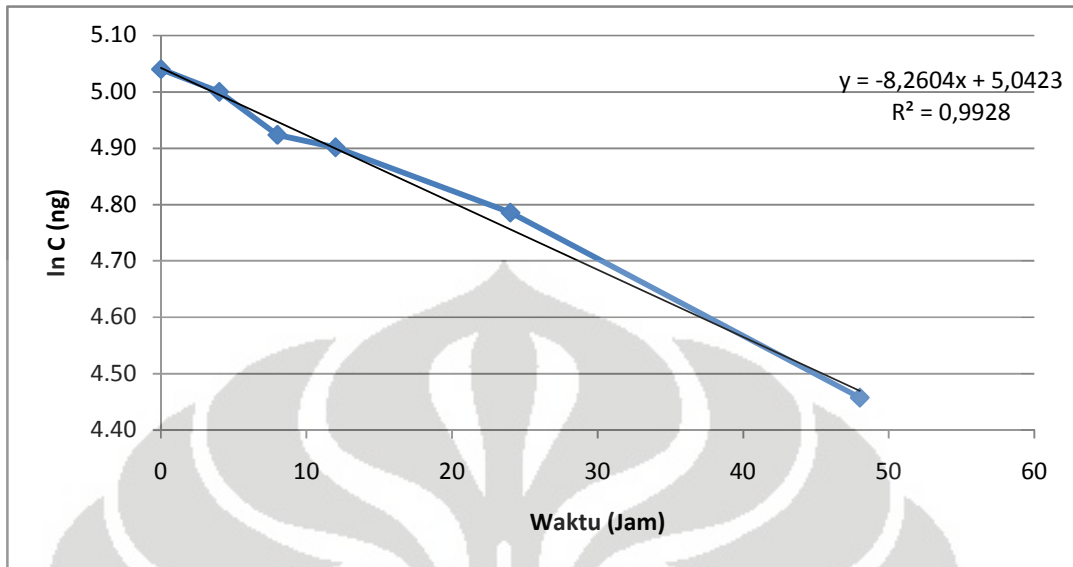
Gambar 12a. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 7,0 pada suhu 50°C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



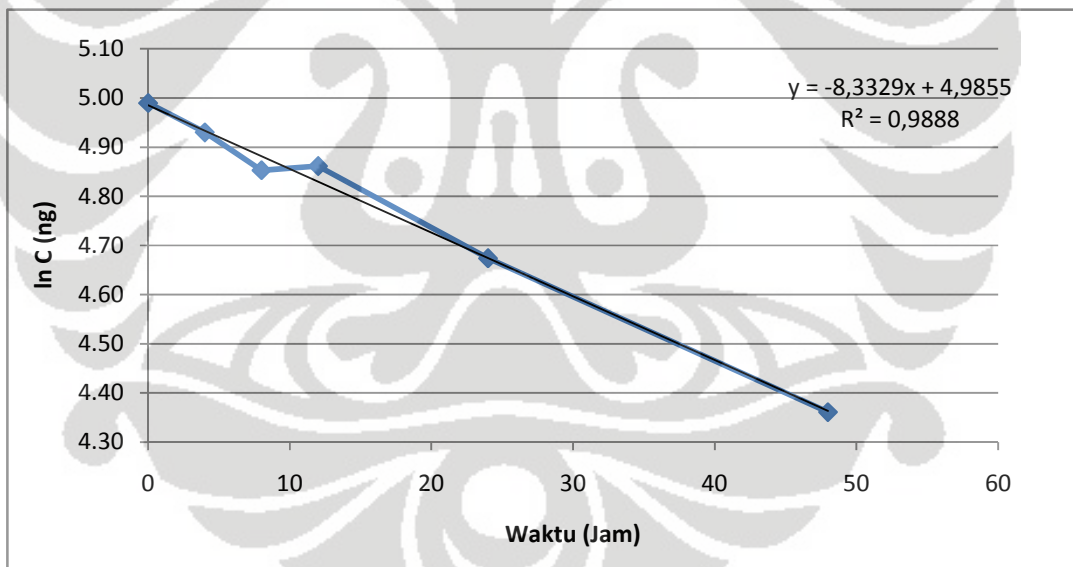
Gambar 12b. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon pH 7,0 pada suhu 60°C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



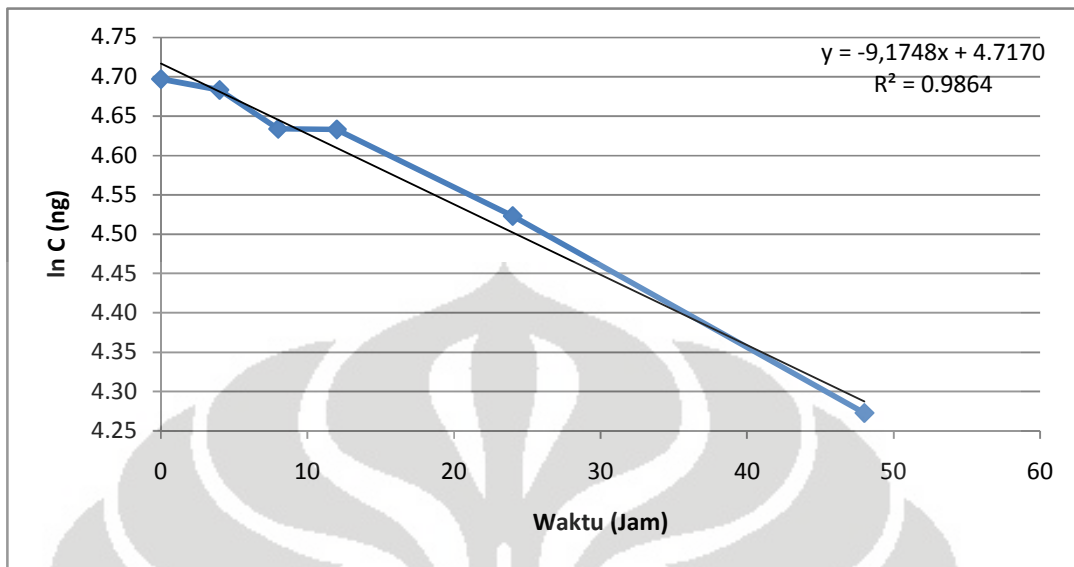
Gambar 12c. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena)sikloheksanon pH 7,0 pada suhu 70°C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



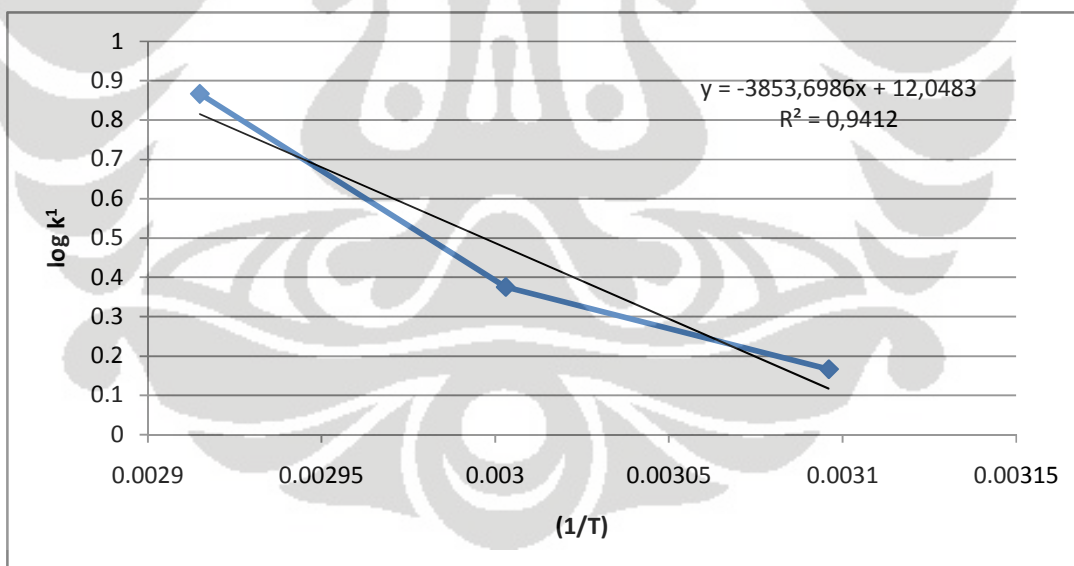
Gambar 12d. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 10,0 pada suhu 50⁰C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



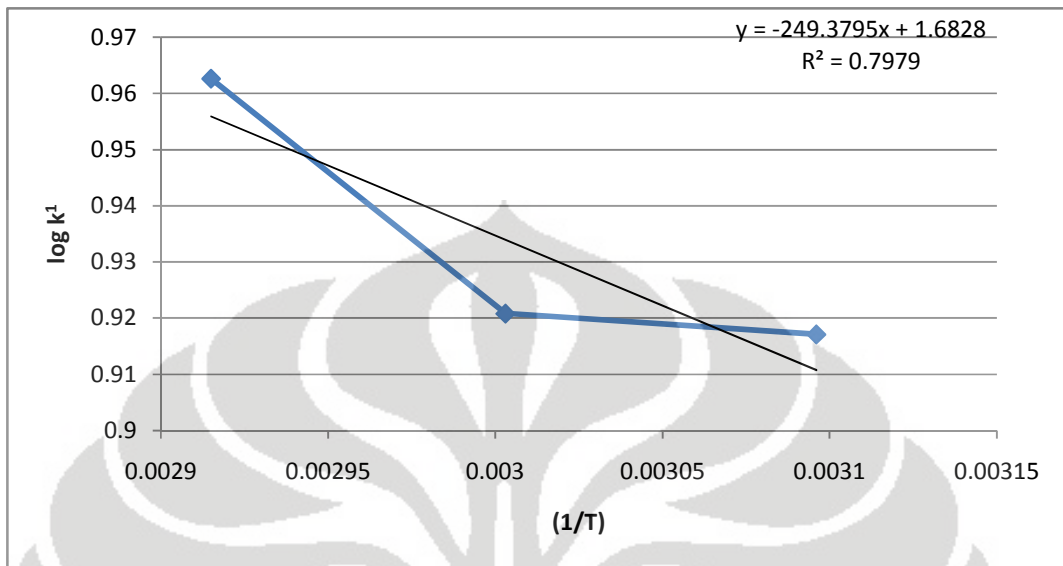
Gambar 12e. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 10,0 pada Suhu 60⁰C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



Gambar 12f. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 10,0 pada suhu 70⁰C hubungan antara ln kadar (kandungan per bercak) terhadap waktu.



Gambar 13a. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 7,0 hubungan antara log k₁ terhadap waktu.



Gambar 13b. Kurva regresi linier 2,6-bis(4-sulfonamidobenzilidena) sikloheksanon pH 10,0 hubungan antara log k_1 terhadap waktu.

Tabel 2
Data Rf pada beberapa macam fase gerak

No	Fase Gerak	Rf
1	kloroform : metanol (9,5:0,5)	0,11
2	kloroform : metanol (8,5:1,5)	0,72
3	diklormetan : etil asetat (5,0:5,0)	0,51
4	diklormetan : metanol (9,0:1,0)	0,56
5	diklormetan : metanol (95:5)	0,31
6	toluen : etilasetat (9,0:1,0)	0,10
7	etil asetat : heksan (50:50)	0,81
8	etil asetat : heksan (70:30)	0,40

Tabel 3

Pembuatan kurva kalibrasi dan pengujian linearitas

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)
64.87	2335.25
86.49	849.21
108.11	3355.66
129.74	3678.36
172.98	4561.19
194.61	4867.44

Persamaan garis regresi linier :

$$y = 19,4282x + 1157,3121$$

$$r = 0,9975$$

Tabel 4

Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Kandungan perbercak (ng)	Area ($\mu\text{v/s}$)	Yi	(y-yi) ²
64.87	2335.25	2417.62	6784.72
86.49	2849.21	2837.69	133.47
108.11	3355.66	3257.69	9597.18
129.74	3678.36	3677.99	0.19
172.98	4561.19	4518.00	1865.19
194.61	4867.44	4938.23	5011.80
	Jumlah		23392.56

$S(y/x) = 76.4731$

Batas deteksi = 11.8086 ppm

Batas kuantitasi = 39.3619 ppm

Tabel 5**Hasil perhitungan uji presisi**

kandungan perberca k (ng)	Area ($\mu\text{v/s}$)	konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi rata-rata	Simpangan Deviasi (SD)	Koefisien Variasi (%) (KV)
64.87	2457.2	66.91	65,26	1.15	1.76
	2420.4	65.01			
	2414.5	64.71			
	2442.0	66.12			
	2430.8	65.55			
	2386.3	63.26			
129.74	3698.3	130.79	129.17	1.11	0.86
	3685.7	130.14			
	3634.3	127.49			
	3669.6	129.31			
	3647.9	128.19			
	3664.9	129.07			
194.61	4878.8	191.55	193.48	2.73	1.41
	4819.6	188.50			
	4931.7	194.27			
	4948.5	195.64			
	4982.8	196.90			
	4936.5	194.52			

Kondisi analisis :

fase gerak diklormetan - metanol (9:1); volume penotolan 2 μl ; panjang gelombang 334 nm.

Tabel 6 a**Data hasil uji stabilitas pada pH 7,0**

Suhu ^o C	50			60			70		
Waktu (Jam)	area (μ v/s)								
	area (μ v/s)	C (ng)	ln C	area (μ v/s)	C (ng)	ln C	area (μ v/s)	C (ng)	ln C
0	4077.9	150.34	5.01	3890.5	140.72	4.95	3652.3	128.41	4.86
4	4035.6	148.23	5.00	3850.8	138.61	4.93	3475.1	119.33	4.78
8	3832.3	137.72	4.93	3715.0	131.63	4.88	3359.7	113.42	4.73
12	3622.0	126.91	4.84	3584.6	124.90	4.83	3280.8	109.31	4.69
24	2972.8	93.42	4.54	2968.6	93.22	4.53	2947.9	92.23	4.52
48	2203.1	53.83	3.99	2348.5	61.31	4.12	2434.7	65.72	4.19

Keterangan :

A = area (luas puncak)

C = kandungan per bercak

Tabel 6 b

Data hasil uji stabilitas pada pH 10,0

Suhu ^o C	50			60			70		
Waktu (Jam)	area (μv/s)	C (ng)	ln C	area (μv/s)	C (ng)	ln C	area (μv/s)	C (ng)	ln C
0	4158.5	154.49	5.04	4012.3	146.90	4.99	3288.0	109.72	4.70
4	4050.1	148.86	5.00	3760.7	134.03	4.93	3256.8	108.13	4.68
8	3829.1	137.46	4.92	3646.4	128.14	4.85	3153.4	102.71	4.63
12	3771.3	134.52	4.90	3667.5	129.22	4.86	3157.2	102.91	4.63
24	3483.9	119.81	4.79	3237.7	107.12	4.67	2946.6	92.14	4.52
48	2834.4	86.34	4.46	2677.9	78.31	4.36	2550.0	71.72	4.27

Keterangan :

A = area (luas puncak)

C = kandungan per bercak

Tabel 7 a

Data hasil analisis regresi linier dari data uji stabilitas pada suhu 50⁰, 60⁰ dan 70⁰C pH 7,0.

Suhu ⁰ C	Hubungan antara C dengan waktu			Hubungan antara ln C dengan waktu		
	Persamaan	r	k ₀	persamaan	r	k ₁
50	y = -2.1186x+152.2800	0.9856	2.1186	y = -1.4662x+5.0753	0.9913	1.4662
60	y = -3.7600x+143.2339	0.9811	3.7600	y = - 2.3714x+4.9995	0.9885	2.3714
70	y = - 9.2686x+125.0130	0.9910	9.2686	Y = - 7.3536x+4.8459	0.9989	7.3536

Keterangan = k₀ = tetapan kecepatan degradasi orde 0

k₁ = tetapan kecepatan degradasi orde 1

Tabel 7 b

Data hasil analisis regresi linier dari data uji stabilitas pada suhu 50⁰, 60⁰ dan 70⁰C pH 10,0.

Suhu ⁰ C	Hubungan antara C dengan waktu			Hubungan antara ln C dengan waktu		
	Persamaan	r	k ₀	persamaan	R	k ₁
50	y = -9.3380x+152.4599	0.9918	9.3380	y = -8.2604x+5.0423	0.9928	8.2604
60	y = -9.3646x+143.4369	0.9801	9.3646	y = - 8.3329x+4.9855	0.9888	8.3329
70	y = - 10.8001x+110.666 8	0.9922	10.8001	Y = - 9.1748x+4.7170	0.9864	9.1748

Keterangan = k₀ = tetapan kecepatan degradasi orde 0

k₁ = tetapan kecepatan degradasi orde 1

Tabel 8 a

Data hasil perhitungan logaritma tetapan kecepatan degradasi (k) pH 7,0 pada suhu 50⁰, 60⁰ dan 70⁰C.

Suhu ⁰ C	T(⁰ K)	1/T (⁰ K ⁻¹)	k ₁	log k ₁
50	323	0.003096	1.4662	0.1662
60	333	0.003003	2.3714	0.3750
70	343	0.002915	7.3536	0.8665

Tabel 8 b

Data hasil perhitungan logaritma tetapan kecepatan degradasi (k) pH 10,0 pada suhu 50⁰, 60⁰ dan 70⁰ C

Suhu ⁰ C	T(⁰ K)	1/T (⁰ K ⁻¹)	k ₁	log k ₁
50	323	0.003096	8.2604	0.9170
60	333	0.003003	8.3329	0.9208
70	343	0.002915	9.1748	0.9626

Lampiran 1

Cara perhitungan kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapatkan persamaan :

Persamaan garis $y = bx + a$, dimana :

Y= Luas puncak / area

X = berat (μg)

A = intersep

b = slope

r = koefisien korelasi

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[(N\sum x^2) - (\sum x)^2][(N\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Lampiran 2

Cara perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Rumus :

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

Batas deteksi : $LOD = \frac{3S(y/x)}{b}$

Batas kuantitasi : $LOQ = \frac{10S(y/x)}{b}$

Keterangan =

b = slope dari kurva kalibrasi; $y = a + bx$

$S_{y/x}$ = Simpangan baru residual

Y = Luas puncak yang diperoleh

y_i = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

n = Jumlah data

Lampiran 3

Cara perhitungan simpangan deviasi dan koefisien variasi

Perhitungan uji keterulangan dilakukan dengan mencari simpangan baku atau standar deviasi (SD) dan koefisien variasi.

$$\text{Rata-rata : } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Simpangan Baku : } SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien Variasi : } KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan =

X = berat / μl (μg)

\bar{x} = berat / μl rata-rata (μg)

n = Jumlah data

Lampiran 4

Cara perhitungan uji stabilitas

Rumus :

$$k = A e^{-E_a/RT} \dots\dots\dots \text{persamaan (1)}$$

$$\text{atau } \log k = \log A - \frac{E_a}{2.303RT} \dots\dots\dots \text{persamaan (2)}$$

Keterangan :

k = tetapan kecepatan degradasi

A = tetapan yang disebut faktor Arrhenius atau faktor frekuensi

E_a = energi aktivasi

R = tetapan gas yaitu 1,987 kal/°K mol

T = suhu mutlak

Lampiran 5

Cara perhitungan waktu kadaluarsa dan energi aktivasi

$$t_1 = \frac{0.693}{k_1}$$

$$t_2 = \frac{0.105}{k_2}$$

$$b = \frac{E_a}{2.303 \times R}$$

Keterangan :

b = slope

E_a = energi aktivasi

k₁ = tetapan kecepatan degradasi pada suhu 25⁰C

R = konstanta gas (1.987 kal/⁰K mol)