



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN KOH TERHADAP STABILITAS
SENYAWA 4-[(E)-2-{4-OKSO-3-(4-METOKSIFENIL)-
KUIAZOLIN-2-IL}ETINIL]BENZENSULFASETAMIDA
YANG DIANALISIS SECARA KROMATOGRAFI
LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

SKRIPSI

**RUDY KURNIAWAN
0906601626**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH PENAMBAHAN KOH TERHADAP STABILITAS
SENYAWA 4-[(E)-2-{4-OKSO-3-(4-METOKSIFENIL)-
KUIAZOLIN-2-IL}ETINIL]BENZENSULFASAMIDA
YANG DIANALISIS SECARA KROMATOGRAFI
LAPIS TIPIS DENSITOMETRI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**RUDY KURNIAWAN
0906601626**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

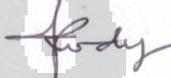
ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Rudy Kurniawan

NPM : 0906601626

Tanda Tangan : 

Tanggal : 24 Januari 2012

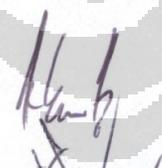
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Rudy Kurniawan
NPM : 0906601626
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh penambahan KOH terhadap stabilitas senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil] benzensulfasetamida yang dianalisis secara kromatografi lapis tipis densitometri

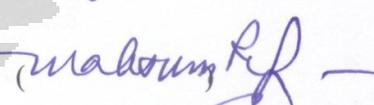
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Ekstensi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt ()

Pembimbing II : Drs. Hayun, M.Si., Apt ()

Penguji I : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt ()

Penguji II : Prof. Dr. Maksum Radji, M.Biomed ()

Penguji III : Dra. Rosmala Dewi, Apt ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 24 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala Puji syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT yang karena rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Shalawat dan salam tak lupa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Skripsi yang berjudul Pengaruh Penambahan KOH Terhadap Stabilitas Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida yang Dianalisis Secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri disusun sebagai syarat untuk mendapat 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.

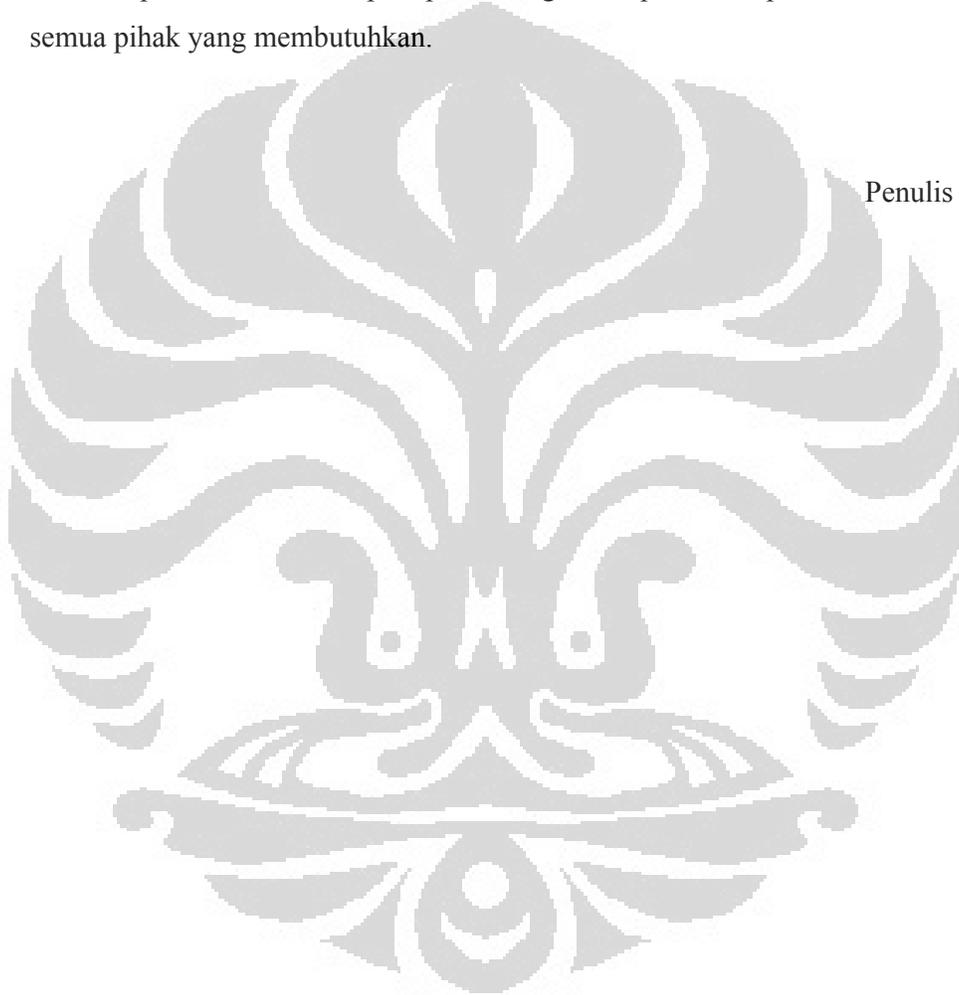
Ucapan terima kasih tak lupa penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Dr. Arry Yanuar M.Si, selaku pembimbing I atas saran, bantuan, dan bimbingan selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunlah skripsi ini.
2. Drs. Hayun M.Si, selaku pembimbing II atas saran, bantuan, dan bimbingan selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunlah skripsi ini.
3. Dra. Maryati Kurniadi M.Si., Apt selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Dra. Azizahwati M.S., Apt selaku Ketua Program Sarjana Ekstensi Farmasi FMIPA-UI.
5. Prof. Dr. Yahdiana Harahap M.S selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA-UI.
6. Seluruh staf pengajar, laboran terutama laboran laboratrium kimia farmasi kuantitatif dan para karyawan Departemen Farmasi Universitas Indonesia,
7. Ibu, bapak, kakak, dan adik yang senantiasa mendoakan dan menyemangati saya selama menempuh pendidikan.

8. Rekan-rekan sejawat Farmasi Ekstensi 2009, para senior atas dukungan semangat kepada penulis.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan namanya yang telah banyak membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penelitian ini masih jauh dari sempurna. Besar harapan penulis agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis 2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rudy Kurniawan
NPM : 0906601626
Program Studi : Ekstensi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

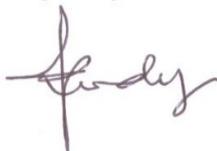
demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh penambahan KOH terhadap stabilitas senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida yang dianalisis secara kromatografi lapis tipis densitometri

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 24 Januari 2012
Yang menyatakan



(Rudy Kurniawan)

ABSTRAK

Nama : Rudy Kurniawan
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Pengaruh penambahan KOH terhadap stabilitas senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida yang dianalisis secara kromatografi lapis tipis densitometri

4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida diperoleh dengan mengkonjugasikan 3-(4-metoksifenil)-2-metil-4(3,4)-kuinazolinon dengan p-formil-benzensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial, katalis natrium asetat asetat dan *dehydrating agent*, anhidrida asetat. Salah satu sifat yang harus diketahui dari senyawa kimia baru adalah sifat kinetiknya. Pada penelitian ini dilakukan pengujian pengaruh larutan KOH terhadap senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida pada tiga tingkatan suhu yaitu 45° C, 65° C, dan 85° C, dianalisis secara kromatografi lapis tipis densitometri. Kondisi analisis menggunakan lempeng siap pakai silica gel 60 F₂₅₄, dan fase gerak terpilih yaitu tetrahidrofuran-sikloheksan-etil asetat (3:3:4). Analisis dilakukan pada panjang gelombang 324 nm. Penggunaan KOH dengan konsentrasi 0,1 M pada uji stabilitas diperoleh nilai $k_1 = 5,6 \times 10^{-4} \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 24,88 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 6,6 hari dan waktu paruh ($t_{1/2}$) = 51,56 hari. Penambahan larutan KOH dapat memutus gugus asetil dari 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida (Rf 0,44) menghasilkan senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida (Rf 0,61).

Kata kunci : Pengaruh KOH, 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida, kromatografi lapis tipis densitometri

xiv+53 halaman : 10 tabel; 12 gambar; 7 lampiran

Daftar acuan : 25 (1958-2011)

ABSTRACT

Name : Rudy Kurniawan
Study Program : Pharmacy Extension
Title : Effect of KOH additions to the stability of the compound 4 - [(E) -2 - {4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazoline-2-yl} ethinyl] benzensulphasetamide which analyzed by thin layer chromatography densitometry

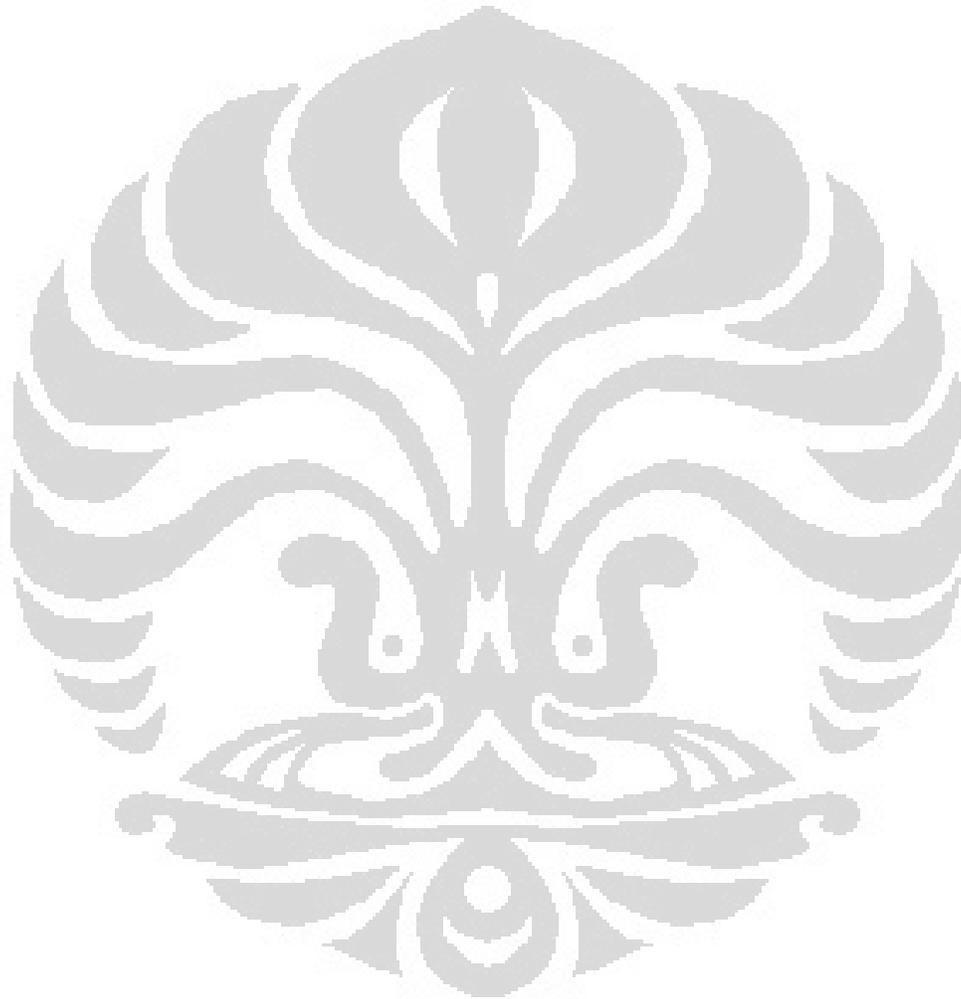
4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazoline-2-yl}-ethinyl] benzensulphacetamide obtained by conjugate 3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-4 (3, 4)-quinazolinon with p-formyl-benzensulphonamide in glacial acetic acid solvent, anhydrous sodium acetate as catalyst and acetic anhydride as dehydrating agent. One of the requirements that should be known of the new chemical compounds is their kinetic properties. This research tested the effect of KOH additions to the stability of 4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazoline-2-yl}ethinyl] benzensulphacetamide at three levels of temperature ie 45°C, 65°C and 85°C were analyzed by densitometry thin layer chromatography. Condition analysis used ready-made silica gel plates 60 F₂₅₄, and the mobile phase was selected tetrahydrofuran- cyclohexane-ethyl acetate (3:3:4). Analyses were performed at a wavelength of 324 nm. In the addition of 0.1 M KOH concentration with a of known value $k_1 = 5,6 \times 10^{-4} \text{ hour}^{-1}$, activation energy (E_a) = 24.88 kcal mol⁻¹, shelf life (t_{90}) = 6,6 days and the half-life time ($t_{1/2}$) = 51,56 days. The addition of KOH solution can hydrolysis the acetyl group of 4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazoline-2-yl}ethinyl]benzensulphacetamide (Rf 0,44) afforded 4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazoline-2-yl}ethinyl] benzensulphonamide (Rf 0,61).

Keywords : KOH effect, 4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-quinazolin-2-yl}ethinyl]benzensulphacetamide, densitometry thin layer chromatography
xiv + 53 pages : 10 tables; 12 figures; 7 appendices
Bibliography : 25 (1958-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 4 - [(E)- 2 - {4 - okso - 3 - (4 - metoksifenil) - kuinazolin - 2 - il} etinil]benzensulfasetamida	3
2.2 4 - [(E) - 2 - {4 - okso - 3 - (4 - metoksifenil) - kuinazolin- 2 il} etinil]benzensulfonamida	4
2.3 Kinetika Kimia.....	5
2.4 Pengaruh Temperatur dan KOH Terhadap Stabilitas Kimia Senyawa	9
2.5 Kromatografi Lapis Tipis	10
2.6 Validasi metode analisis	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.3 Tahapan Penelitian	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Optimasi Metode Analisis Menggunakan KLT Densitometri.....	22
4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)- kuinazolin-2-il}etinil]benzensulfasetamida	25
4.3 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	26
4.4 Uji Keterulangan	27
4.5 Uji Selektivitas	28
4.6 Uji Stabilitas	28

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
 DAFTAR ACUAN	 41



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida	3
Gambar 2.2	Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida.....	4
Gambar 2.3	Plot garis lurus C terhadap waktu untuk reaksi orde-pertama	7
Gambar 2.4	Plot garis lurus lnC terhadap waktu untuk reaksi orde-pertama	8
Gambar 4.1	Kurva serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida 10 ppm dalam pelarut tetrahidrofuran pada panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis	22
Gambar 4.2	Kurva serapan bercak 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida pada panjang gelombang 324 nm dengan <i>TLC Scanner</i>	23
Gambar 4.3	Kurva kalibrasi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida	26
Gambar 4.4	Kurva densitas selektivitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dengan fase gerak tetrahidrofuran-sikloheksan-etil asetat (3:3:4) pada 324 nm	28
Gambar 4.5	Kurva regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dalam KOH 1M suhu 45° C	31
Gambar 4.6	Kurva regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dalam KOH 0,1M suhu 45°, 65°, dan 85°C	33
Gambar 4.7	Kurva regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida pada kondisi penambahan KOH 0,1 M, hubungan antara ln k ₁ terhadap 1/T	35
Gambar 4.8	Hasil elusi lempeng silica gel 60 F ₂₅₄ yang dilihat pada panjang gelombang 254 nm menggunakan fase gerak tetrahidrofuran-sikloheksan-etil asetat (3:3:4) perlakuan sampel pada suhu 45°C dengan penambahan KOH 0,1 M ...	38

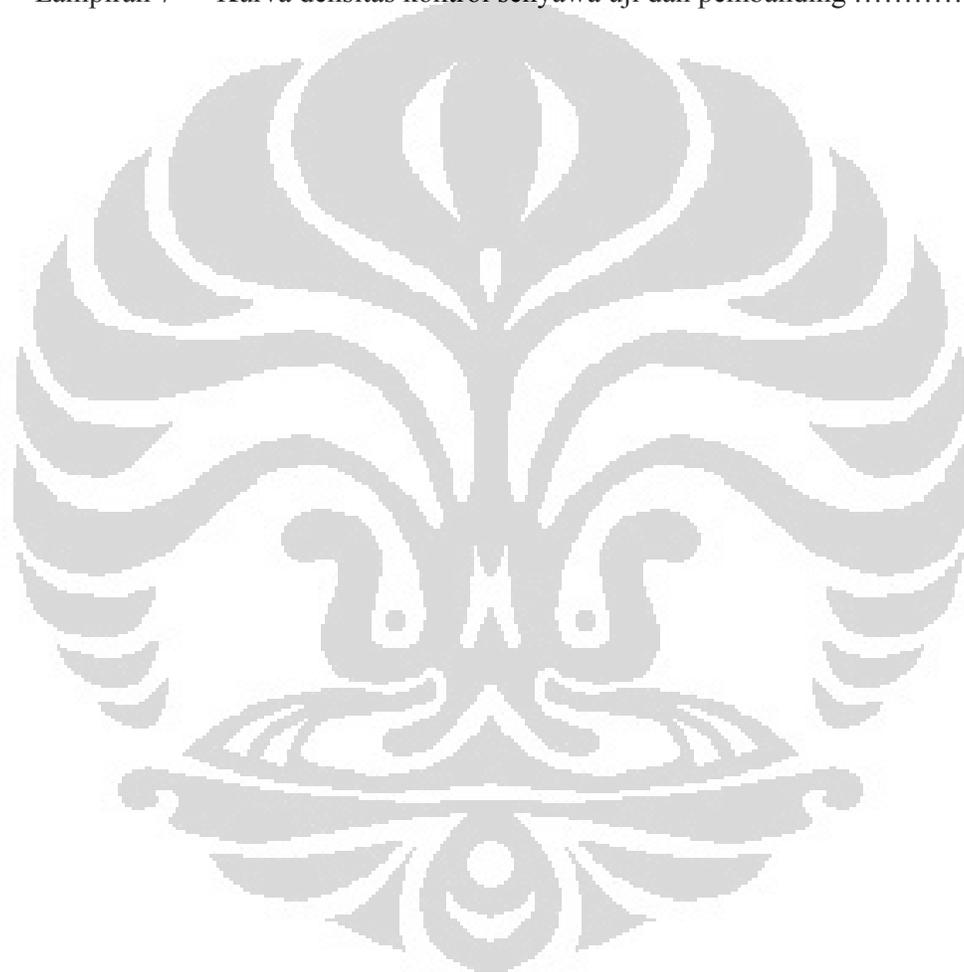
DAFTAR TABEL

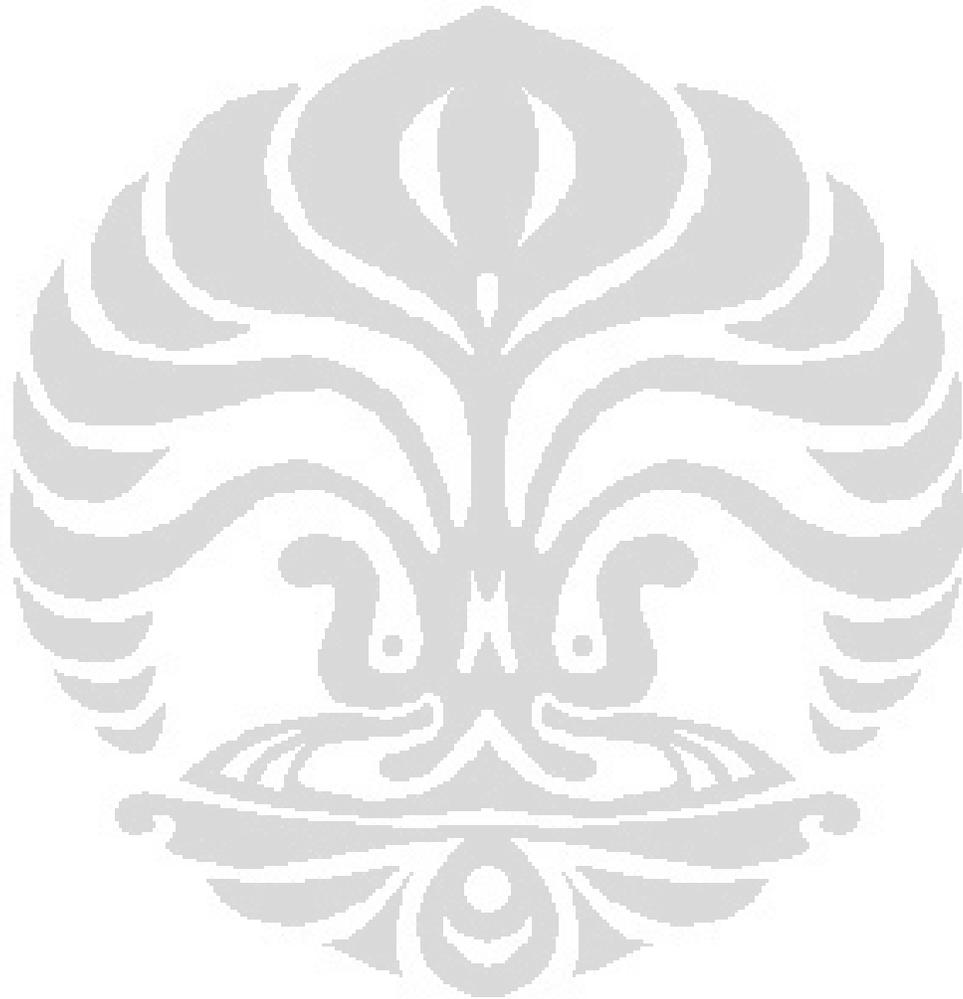
Tabel 2.1	Persamaan laju dan waktu paruh	10
Tabel 4.1	Data Rf pada beberapa macam fase gerak	24
Tabel 4.2	Data kurva kalibrasi	25
Tabel 4.3	Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi.....	26
Tabel 4.4	Hasil perhitungan uji presisi.....	27
Tabel 4.5	Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 1M.....	30
Tabel 4.6	Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 0,1 M.....	32
Tabel 4.7	Data hasil analisis regresi linear dari data uji stabilitas pada suhu 45°, 65°, dan 85° C dalam larutan KOH 0,1M	34
Tabel 4.8	Data hasil perhitungan tetapan kecepatan degradasi (k) KOH 0,1 M pada suhu 45°, 65°, 85 °C	34
Tabel 4.9	Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 0,01 M	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara perhitungan kurva kalibrasi.....	44
Lampiran 2	Cara perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ).....	45
Lampiran 3	Cara perhitungan simpangan deviasi dan koefisien variasi.....	46
Lampiran 4	Skema kerja uji stabilitas.....	47
Lampiran 5	Gambar Alat-alat	48
Lampiran 6	Kurva densitas serapan pada optimasi pemilihan fase gerak	49
Lampiran 7	Kurva densitas kontrol senyawa uji dan pembanding	53





BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida merupakan senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida yang terasetilasi pada gugus NH-sulfonamidanya. Senyawa tersebut diperoleh dengan mengkonjugasikan 3-(4-metoksifenil)-2-metil-4(3,4)-kuinazolinon dengan p-formil-benzensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial, natrium asetat anhidrat sebagai katalis dan anhidrida asetat sebagai *dehydrating agent* dan pengasetilasi (Hudiyono dan Hayun, 2011). Struktur senyawa tersebut mempunyai kemiripan dengan senyawa golongan diarilheterosiklik, yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif siklooksigenase-2.

Hasil studi penambatan molekul menunjukkan bahwa senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida diprediksi memiliki aktivitas sebagai inhibitor siklooksigenase-2 (Hayun *et al.*, 2011). Terdapat perbedaan pada substitusi pada posisi para di salah satu cincin arilnya, dimana pada 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida terdapat substitusi gugus asetil yang terikat pada gugus -NH. Adanya perbedaan pada substitusi gugus asetil tersebut tidak memberikan efek yang berbeda dalam hal selektifitasnya terhadap siklooksigenase-2 (Corruzi, Gabriella, Nicola, Venturi, Silvana, Spaggiari, 2007).

Sebagai senyawa kimia baru yang diduga memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif siklooksigenase-2. Maka dirasa perlu untuk mengetahui kestabilan senyawa secara kimia terhadap kondisi ekstrim, sebagai data awal untuk pengembangan pengujian selanjutnya. Disebutkan dengan penambahan KOH 1M dengan suhu 100°C selama 1 jam, akan dapat menghidrolisis gugus sulfasetamid (Vogel, 1958). Sulfasetamida sendiri termasuk golongan senyawa amida, yang memiliki suatu nitrogen trivalen yang terikat pada satu gugus karbonil. Amida sendiri dapat terhidrolisis baik dalam larutan asam maupun basa. Kedua macam reaksi hidrolisis ini bersifat tidak reversibel. Sifat tersebut merupakan dasar pemikiran untuk melakukan penelitian tentang stabilitas kimia

senyawa berdasarkan kemampuan senyawa dengan gugus sulfasetamida untuk terhidrolisis pada asam maupun basa (Fessenden, 1982).

Berdasarkan hal tersebut dilakukan pengujian efek penambahan KOH terhadap stabilitas kimia senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida agar dapat diketahui parameter kinetika secara kimia dari senyawa. Pemilihan KOH sendiri selain karena merupakan basa yang dapat menghidrolisis gugus sulfasetamida (Vogel, 1958) juga dikarenakan kelarutan senyawa di dalamnya serta keterbatasan karakterisasi kelarutan senyawa uji dalam larutan dapar, air dan asam, sehingga digunakan KOH sebagai agen penghidrolisis.

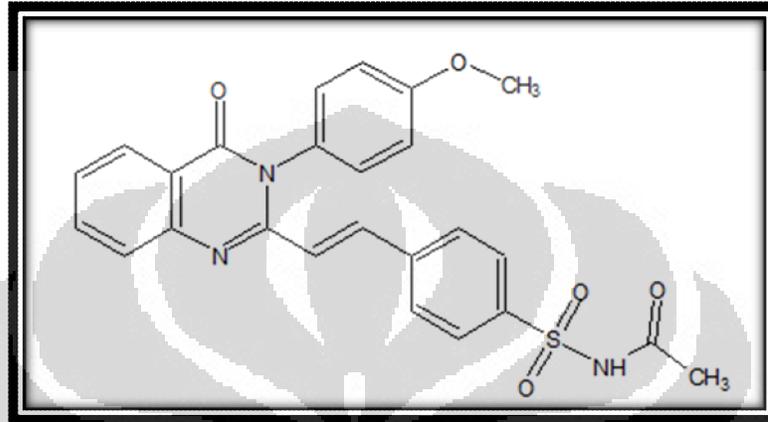
Analisis secara kuantitatif senyawa dilakukan secara kromatografi lapis tipis (KLT) densitometri.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi KOH dan perlakuan suhu tertentu terhadap stabilitas kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida yang dianalisis secara kromatografi lapis tipis densitometri.
- 1.2.2 Mengetahui tetapan kecepatan degradasi (k_1), energi aktivasi (E_a), *shelf life* (t_{90}), dan waktu paruh ($t_{1/2}$) pada suhu 25° C (suhu kamar) dari tiap konsentrasi KOH yang ditambahkan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfasetamida



[Sumber: Huidiyono dan Hayun, 2011]

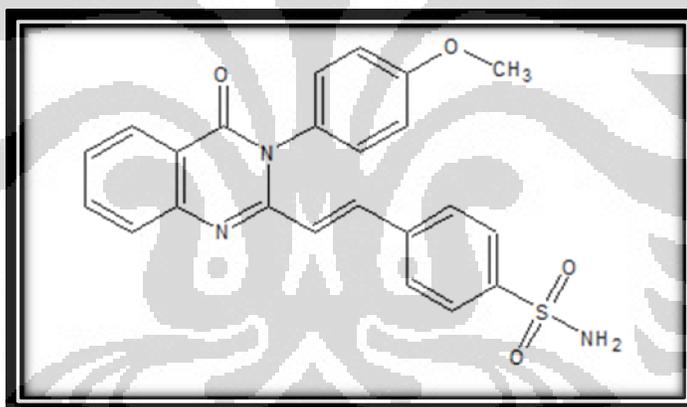
Gambar 2.1 Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfasetamida

- Rumus molekul : $C_{25}H_{21}N_3O_5S$
Berat molekul : 385,1
Organoleptis : Hablur serbuk; berwarna kuning kehijauan; tidak berbau
Titik lebur : 255° - 257° C
Kelarutan : Larut dalam basa; tetrahidrofur (THF); tidak larut dalam air; asam, dan kloroform. (Hayun, 2011)

Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfasetamida merupakan senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfonamida yang terasetilasi pada gugus NH-sulfonamidanya. Senyawa tersebut diperoleh dengan mengkonjugasikan 3-(4-metoksifenil)-2-metil-4(3,4)-kuinazolinon dengan p-formil-bensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial, katalis natrium anhidrida asetat dan anhidrida asetat sebagai *dehydrating agent* (Huidiyono dan Hayun, 2011).

Uji stabilitas kimia pada senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida didasarkan pada sifat gugus sulfasetamid dan N-sulfasetamid yang akan terhidrolisis apabila dididihkan dengan kalium hidroksida 5% selama 1 jam (Vogel, 1958). Pemilihan larutan KOH sebagai pereaksi dalam pengujian stabilitas didasarkan dari kelarutan senyawa uji yang tidak larut dalam air dan asam, sehingga dipilih agen alkali sebagai pereaksi dalam uji stabilitas senyawa (Hayun, 2011). Senyawa ini merupakan senyawa baru yang belum diuji aktivitas farmakologinya, namun berdasarkan struktur kimianya senyawa ini termasuk dalam golongan diarilheterosiklik, yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif COX-2, walaupun aktivitasnya masih harus dibuktikan lebih lanjut.

2.2 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida



[Sumber: Hudyono dan Hayun, 2011]

Gambar 2.2 Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida

Rumus molekul : $C_{23}H_{19}N_3O_4S$
 Berat molekul : 193,1
 Organoleptis : Hablur serbuk; berwarna kuning pucat; tidak berbau
 Titik lebur : $228^{\circ} - 229^{\circ} C$

Kelarutan : Larut dalam basa; tetrahidrofur (THF); etil asetat; tidak larut dalam air; asam, dan kloroform. (Hudiyono dan Hayun, 2011)

Senyawa ini merupakan salah satu analog dari senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil)-kuinazolin-2-il]etnil]bensulfonamida yang telah dilakukan skrining *virtual* menggunakan perangkat lunak (*software*) PLANTS (*Protein-Ligand ANT System*) terhadap siklooksigenase-2 (COX-2). Hasil skrining menunjukkan senyawa tersebut diprediksi memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif terhadap siklooksigenase-2. Hal tersebut berdasarkan pose ikatan antara ikatan senyawa dengan ligan yang memiliki kemiripan dengan senyawa SC558 yang merupakan senyawa dengan aktivitas inhibitor selektif COX-2 (Hayun *et.al*, 2011).

Siklooksigenase sendiri merupakan enzim yang dibutuhkan dalam biosintesis prostaglandin yang bertanggung jawab terhadap respon rasa nyeri, berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Terdapat dua isoform siklooksigenase, yaitu siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). COX-1, umumnya terdapat pada saluran cerna dan berperan pada mekanisme sitoprotektif pada lambung. Sedangkan COX-2 terdapat di hampir semua jaringan kecuali di saluran pencernaan dan lebih berperan dalam respon rasa nyeri. Pada umumnya obat-obat inhibitor COX tidak bersifat selektif, sehingga memiliki kemampuan untuk menghambat kedua enzim. Adanya hambatan non-selektif pada kedua enzim dapat mengakibatkan tukak lambung. Sehingga diperlukan pengembangan senyawa kimia yang memiliki potensi sebagai inhibitor selektif COX-2 agar efek samping dapat dihindari. (Syarif *et al.*, 2007)

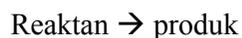
2.3 Kinetika Kimia

2.3.1 Laju reaksi

Bidang kimia yang mempelajari kecepatan, atau laju, terjadinya reaksi kimia dinamakan kinetika kimia. Kata kinetik menyiratkan gerakan atau perubahan. Di sini kinetika merujuk pada laju reaksi, yaitu perubahan konsentrasi reaktan atau produk terhadap waktu (M/s). Dengan kata lain laju reaksi mengukur

seberapa cepat reaktan habis bereaksi atau seberapa cepat produk terbentuk. Lalu dinyatakan sebagai perbandingan perubahan konsentrasi terhadap waktu.

Telah diketahui bahwa setiap reaksi dapat dinyatakan dengan persamaan umum:



Persamaan ini menjelaskan bahwa, selama berlangsungnya suatu reaksi, molekul reaktan bereaksi sedangkan molekul produk terbentuk. Sebagai hasilnya, dapat diamati jalannya reaksi dengan cara memantau penurunan konsentrasi reaktan atau peningkatan konsentrasi produk. Dapat kita misalkan persamaan di atas sebagai berikut:



Menurunnya jumlah molekul A dan meningkatnya jumlah molekul B seiring dengan waktu reaksi berlangsung dapat kita nyatakan laju reaksinya sebagai:

$$\text{Laju} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} \quad (2.1) \quad \text{atau} \quad \text{laju} = \frac{\Delta[B]}{\Delta t} \quad (2.2)$$

dengan $\Delta[A]$ dan $\Delta[B]$ adalah perubahan konsentrasi (dalam molaritas) selama waktu Δt . karena konsentrasi A menurun selama selang waktu tersebut, $\Delta[A]$ merupakan kuantitas negatif. Laju reaksi adalah kuantitas positif, sehingga tanda minus diperlukan dalam rumus laju agar nilainya menjadi positif (2.1). Sebaliknya, laju pembentukan produk tidak memerlukan tanda minus sebab $\Delta[B]$ adalah kuantitas positif (konsentrasi B meningkat seiring waktu). (Chang, 2004)

2.3.2 Orde Reaksi

Orde reaksi menunjukkan cara bagaimana konsentrasi pereaksi mempengaruhi laju suatu reaksi kimia. Seringkali pengaruh konsentrasi reaktan terhadap laju reaksi dapat diketahui dari orde reaksinya (Martin *et al.*, 1993).

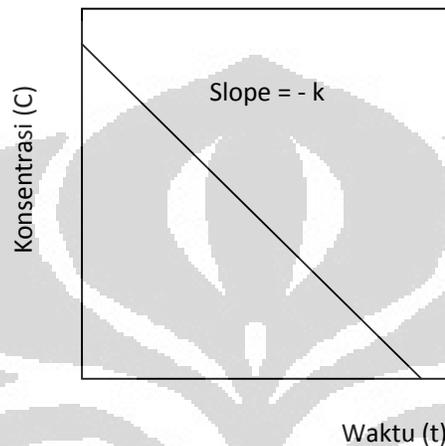
2.3.2.1 Reaksi Orde Nol

Hasil dekomposisi terjadi pada laju konstan dan tidak bergantung dari konsentrasi pada reaktan (Lachman *et al.*, 1994). Bila jumlah reaktan C berkurang

dalam suatu jarak waktu yang tetap, t , maka laju hilangnya reaktan dinyatakan sebagai:

$$\frac{dC}{dt} = -k \quad (2.3)$$

k adalah tetapan laju reaksi orde nol dan dinyatakan dalam satuan konsentrasi/waktu.



Gambar 2.3 Plot garis lurus konsentrasi (C) terhadap waktu (t)

Untuk menentukan jenis orde reaksi dapat dilakukan dengan memplotkan konsentrasi (C) terhadap waktu (t), jika didapat garis lurus seperti yang ditunjukkan Gambar 2.3, maka reaksi dikatakan mengikuti orde 0. Dari kurva tersebut akan didapat persamaan garis:

$$C_t = -kt + C_0 \quad (2.4)$$

Di mana C_t = konsentrasi pada waktu t ; C_0 = konsentrasi awal; t = waktu, dan k = laju reaksi. Dari persamaan 2.3 dapat diketahui nilai laju reaksi yaitu:

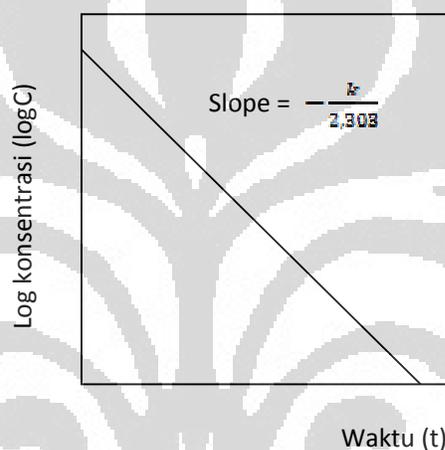
$$k = \frac{C_0 - C_t}{t} \quad (2.5)$$

Waktu paruh adalah waktu yang dibutuhkan untuk meluruh atau hilangnya zat menjadi separuhnya, yakni waktu di mana C_0 berkurang menjadi $\frac{1}{2} C_0$ (Martin *et al.*, 1993). Harga $t_{1/2}$ reaksi orde nol adalah sebanding dengan jumlah atau konsentrasi awal reaktan dan berbanding terbalik dengan tetapan laju reaksi orde nol, dapat dilihat pada persamaan 2.6:

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k} \quad (2.6)$$

2.3.2.2 Reaksi Orde Pertama

Laju reaksi bergantung pada konsentrasi dari suatu reaktan. (Attwood & Alexander, 2008). Dalam reaksi jenis ini, suatu zat terurai langsung menjadi satu atau beberapa reaksi. Laju reaksi berbanding langsung dengan konsentrasi zat yang bereaksi dan secara sistematis.



Gambar 2.4 Plot garis lurus log konsentrasi (log C) terhadap waktu (t)

Untuk menentukan jenis orde reaksi dapat dilakukan dengan memplotkan log konsentrasi (log C) terhadap waktu (t), jika didapat garis lurus seperti yang ditunjukkan Gambar 2.4, maka reaksi dikatakan mengikuti orde 1. Dari kurva tersebut akan didapat persamaan garis:

$$\log C_t = -\frac{k}{2.303} t + \log C_0 \quad (2.7)$$

$$\ln C_t = -kt + \ln C_0$$

Dalam bentuk eksponensial persamaan menjadi

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (2.8)$$

Di mana C_t = konsentrasi pada waktu t ; C_0 = konsentrasi awal; t = waktu, dan k = laju reaksi.

Nilai waktu paruh ($t_{1/2}$) reaksi orde satu adalah konstan. Tanpa perlu diperhatikan berapa jumlah atau konsentrasi obat pada keadaan awal, maka waktu yang diperlukan untuk berkurang menjadi separuhnya adalah konstan. Harga $t_{1/2}$ untuk reaksi orde kesatu adalah:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (2.9)$$

2.4 Pengaruh Temperatur dan KOH Terhadap Stabilitas Kimia Senyawa

Sejumlah faktor lain, selain konsentrasi dapat mempengaruhi kecepatan reaksi. Diantaranya adalah temperatur dan agen pereaksi. Laju reaksi meningkat dengan adanya peningkatan suhu (Chang, 2004). Kecepatan berbagai reaksi bertambah kira-kira dua atau tiga kalinya tiap kenaikan 10°C (Martin *et al.*, 1993).

Pengaruh temperatur terhadap laju ini diberikan dengan persamaan yang pertama kali dikemukakan oleh Arrhenius,

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (2.10)$$

atau

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (2.11)$$

Di mana k adalah laju reaksi spesifik, A adalah konstanta yang disebut faktor frekuensi yang menyatakan frekuensi tumbukan, E_a adalah energi aktivasi, R adalah konstanta gas, $1,987$ kal/derajat mol, dan T adalah temperatur absolut (Martin *et al.*, 1993). Persamaan (2.11) dapat diubah menjadi bentuk persamaan linear:

$$\ln k = \left(-\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \quad (2.12)$$

$$\begin{array}{ccccccc} \downarrow & & \downarrow & \downarrow & & \downarrow & \\ y & = & b & x & + & a & \end{array}$$

Jadi, plot $\ln k$ terhadap $1/T$ menghasilkan garis lurus yang kemiringannya b sama dengan $-E_a/R$ dan titik potong a dengan sumbu y adalah $\ln A$ (Chang, 2004). Persamaan yang diperoleh akan dapat dihitung harga k pada suhu kamar

serta besarnya E_a (Energi aktivasi) proses degradasi dan harga *shelf-life* (t_{90}) dari laju peruraian suatu senyawa (Oetari & Yuwono, 2004).

Pengaruh pereaksi sendiri terhadap laju reaksi dalam hal ini yaitu KOH, akan berakibat terjadinya reaksi hidrolisis pada gugus sulfasetamid dari senyawa, sehingga dihasilkan senyawa tanpa gugus asetil sebagai hasil reaksi. Sulfasetamid sendiri termasuk golongan senyawa amida, yang memiliki suatu nitrogen trivalen yang terikat pada satu gugus karbonil. Amida sendiri dapat terhidrolisis baik dalam larutan asam maupun basa. Kemampuan untuk terhidrolisis tersebut merupakan dasar pemikiran untuk melakukan penelitian tentang stabilitas kimia senyawa berdasarkan kemampuan senyawa dengan gugus sulfasetamida untuk terhidrolisis pada asam maupun basa (Fessenden, 1982). Pada penelitian ini digunakannya KOH sebagai agen pereaksi berdasarkan kelarutan senyawa uji terhadap larutan basa.

2.5 Kromatografi Lapis Tipis

Berbeda dengan kromatografi kolom yang fase diamnya diisikan di dalam kolom, kromatografi lapis tipis fase diamnya merupakan lapisan uniform bidang datar yang didukung oleh pelat kaca, pelat alumunium, pelat plastik. Fase mobil yang dikenal sebagai pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur akan bergerak sepanjang fase diam di bawah pengaruh efek kapiler (*ascending*), pengaruh gravitasi (*descending*) (Muhammad & Suharman, 1995).

Boleh dikatakan kromatografi lapis tipis merupakan bentuk terbuka dari kromatografi kolom. Sehingga kromatografi lapis tipis ini pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian pula peralatan yang diperlukan sangat sederhana dan boleh dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat dengan cepat (Muhammad & Suharman, 1995).

Sebagai fase diam pada kromatografi lapis tipis (KLT) adalah bahan padat yang diletakkan pada pelat gelas secara uniform dengan ketebalan lebih kurang 0,250 mm. Di samping pelat gelas juga sudah umum digunakan pelat dari logam atau plastik untuk memudahkan dokumentasi. KLT merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam di

bawah gerakan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur. Pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan (Muhammad & Suharman, 1995).

Fase diam yang umum dan banyak dipakai adalah silika gel yang dicampur dengan CaSO_4 untuk menambah daya lengket partikel silika gel pada pendukung (pelat). Adsorban lain yang banyak dipakai adalah alumina, kieselguhr, celite, serbuk *sellulose*, serbuk poliamida, kanji, dan sephadex. Perlu diperhatikan bahwa ukuran partikel dibuat pada rentang kehalusan tertentu 1-25 μ dalam keadaan uniform. Keadaan uniform fase diam ini untuk tujuan didapatnya pemisahan yang baik, laju aliran pelarut pengembang yang cepat dan merata (Muhammad & Suharman, 1995).

2.5.1 Penentuan Kromatogram (Muhammad & Suharman, 1995)

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah visualisasi dengan cara fisika atau kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan melihat noda kromatogram yang mengadsorpsi radiasi ultraviolet atau berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet pada $\lambda = 254 \text{ nm}$ atau $\lambda = 365 \text{ nm}$. Pada adsorban yang berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet karena telah dicampur dengan zat kimia yang berfluoresensi maka noda akan tampak sebagai pemataman fluoresensi (*quencing fluorescensi*).

Visualisasi dengan cara kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik. Visualisasi cara kimia ini dilakukan dengan cara penyemprotan dengan *atomizer* atau memberikan uap zat kimia pada kromatogram atau dengan cara pencelupan ke dalam pereaksi penampak warna. Perlu diperhatikan bahwa penyemprotan dengan pereaksi kimia ini diusahakan jangan sampai merusak lapisan adsorban pada pelat dan diusahakan warna kromatogram yang cukup stabil dalam jangka waktu lama.

2.5.2 Jenis Fase Diam KLT (Muhammad & Suharman, 1995)

Fase diam KLT memiliki beberapa macam sifat polaritas. Silica gel dikenal sebagai fase diam yang polar dan dapat dibuat nonpolar (RP = *Reversed Phase*) setelah dilakukan pengikatan gugus hidroksilnya dengan C_2 , C_8 , atau C_{18} . Untuk pemisahan komponen sampel non polar atau hidrofobik (tidak larut dalam air)

pada proses pemisahan adsorpsi diusahakan pelarut pengembangan atau pelarut pengembang campur digunakan yang bersifat non polar. Pada prinsipnya diusahakan pemisahan dengan KLT dilakukan dalam keadaan netral.

Fase diam yang banyak terpilih adalah silica gel, yang dibuat lapisan tipis uniform pada pelat kaca, logam, atau plastik dengan ketebalan 0,25 mm. Lapisan tipis silica gel atau adsorban yang lainnya dapat dibuat sendiri atau sudah dalam bentuk jadi yang dikenal sebagai "*pre coated plate*". Pada beberapa produksi dikenal beberapa macam silica gel antara lain: silica gel G adalah silica gel yang dicampur perekat CaSO_4 , lebih kurang 13 %. Silica gel GF adalah silica gel yang dicampur perekat CaSO_4 dan indikator fluorescensi.

Di samping tanda G (*gypsum*) yang menyertai nama silica gel dikenal pula silica gel H atau yang berarti tanpa bahan pengikat. Silica gel HF adalah silica gel yang tanpa pengikat akan tetapi memakai indikator ultraviolet. *Manganese-activated zink silicate* adalah indikator UV yang dicampur dengan silica gel sebanyak 2 % dan indikator UV ini memberikan puncak aktivitas pada $\lambda = 254$ nm, dengan memantulkan radiasi hijau. Noda kromatogram akan tampak gelap dengan latar belakang berwarna hijau. Radiasi UV lain yang digunakan untuk visualisasi kromatogram adalah pada $\lambda = 366$ nm dengan pantulan radiasi hijau pada pelat silica gel HF.

2.5.3 Profil Kromatogram

Kromatogram pada pelat KLT akan tampak setelah visualisasi dengan cara fisika atau cara kimia. Noda kromatogram tiap-tiap komponen yang terpisah setelah visualisasi tampak sebagai noda yang bulat apabila terjadi proses pemisahan dengan baik. Pengekoran noda kromatogram terjadi apabila proses pemisahan yang terjadi tidak sempurna yang digambarkan dengan noda yang tidak bulat (berekor).

Terlalu tingginya konsentrasi komponen yang ditentukan juga merupakan salah satu penyebab terjadinya kromatogram yang berekor. Penyebab pengekoran lain adalah ketidakjenuhan tank (*chamber*) KLT sehingga fase mobil (gerak) yang mengelusi pelat KLT segera menguap dalam ruangan tangki KLT. Ketidaktepatan pemilihan fase mobil terhadap pemilihan fase diam dan macam sampel yang dianalisis juga merupakan penyebab pengekoran kromatogram lainnya. Oleh

sebab itu pada pelaksanaannya harap diperhatikan beberapa masalah antara lain: aktivasi fase diam pada pelat, dengan jalan memanaskannya pelat KLT dalam tanur dengan suhu 105°-110°C selama waktu 60 menit dan pendinginan dalam desikator. (Muhammad & Suharman, 1995) Atau pemanasan pelat KLT juga dapat dilakukan pada suhu 120°C selama 30 menit. (Deinstrop, 2007)

Analisis kuantitatif menggunakan metode KLT densitometri ini bukan tanpa kelemahan, masalah seperti keterulangan dan ketersediaan senyawa setelah dilakukannya pemisahan senyawa melalui tahapan elusi perlu diperhatikan dengan serius dalam pengerjaannya. Pengamatan terhadap perbandingan jumlah senyawa yang ditotolkan pada lempeng, serta kejenuhan *chamber* harus dievaluasi dan pengkondisian tersebut harus dilakukan secara langsung untuk membuat pemisahan yang baik dari senyawa pada bercak. Biasanya digunakan mikropipet kapiler untuk menotolkan sampel pada lempeng. Kemampuan sifat kapilaritas dari mikropipet sangat bergantung pada tegangan permukaan, viskositas, serta tetapan gravitasi dari senyawa uji. (Stahl, 1969)

Tahap penotolan senyawa uji pada metode KLT densitometri adalah tahap terpenting agar dihasilkan hasil analisis yang akurat. Bercak hasil totolan harus sekecil mungkin, dan tidak lebih dari 1-2 mm untuk diameternya. Senyawa uji yang akan ditotolkan memiliki konsentrasi 0,01-1,00 % dalam pelarut yang agak semi polar yang dapat melarutkan senyawa uji. Pelarut yang memiliki titik didih atau polaritas yang tinggi akan susah untuk menguap setelah tahap penotolan pada lempeng. Kebersihan peralatan yang digunakan pada metode ini juga harus diperhatikan terutama dari debu, karena partikel debu dapat mengganggu evaluasi lempeng pada metode flourometri. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel juga harus dipastikan telah menguap sebelum lempeng dielusi. Pengeringan menggunakan udara panas seperti *hair dryer* dimungkinkan untuk menguapkan pelarut. (Rogers, 1976)

Pada kromatogram KLT dikenal istilah atau pengertian faktor retardasi (R_f) untuk tiap-tiap noda kromatogram yang didefinisikan sebagai jarak migrasi komponen yang dibandingkan dengan jarak migrasi fase gerak. Sedangkan untuk tujuan kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan noda kromatogram

sampel dengan noda kromatogram standar, yang dikenal dengan faktor retensi relatif (R_x); dimana $R_x = \frac{\text{jarak migrasi komponen sampel}}{\text{jarak migrasi standar}}$ (2.13)

(Muhammad & Suharman, 1995)

2.5.4 KLT Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental yang mendasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak pada KLT. Densitometri lebih dititikberatkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar kecil, yang mana diperlukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Untuk evaluasi bercak hasil KLT secara densitometri, bercak di-*scanning* dengan sumber sinar dalam bentuk celah (*slit*) yang dapat dipilih baik panjangnya maupun lebarnya. Sinar yang dipantulkan diukur dengan sensor cahaya (fotosensor). Perbedaan antara signal optik daerah yang tidak mengandung bercak dengan daerah yang mengandung bercak dihubungkan dengan banyaknya analit yang ada melalui kurva kalibrasi yang telah disiapkan dalam lempeng yang sama. Pengukuran densitometri dapat dibuat dengan absorbansi atau dengan fluoresensi. (Abdul Rohman, 2009) Untuk dokumentasi kromatogram planar, pencitraan elektronik telah secara luas menggantikan fotografi. Gambar elektronik yang mudah diarsipkan dan dapat diambil setiap saat berubah. Ini adalah keuntungan tambahan bahwa gambar yang diambil dapat dengan mudah dievaluasi dengan perekam densitometri.

Terdapat tiga sumber radiasi tergantung rentang panjang gelombang penentuannya. Pada umumnya spektrofotodensitometri memberikan rentang gelombang penentuan 200-630 nm. Lampu D_2 (Deuterium) digunakan untuk pengukuran pada daerah ultra violet dan lampu tungstein pada pengukuran sinar tampak. Untuk pengukuran pendar fluor dan pemadaman pendar fluor dipakai lampu busur Hg bertekanan tinggi. Sama seperti pada spektrofotometri, pada KLT densitometri analisis juga dilakukan pada panjang gelombang maksimal. (Muhammad & Suharman, 1995)

2.6 Validasi Metode Analisis (Harmita, 2006)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

2.6.1 Keseksamaan

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 dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang.

Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16% dan pada kadar part per bilion (ppb) adalah 32%. Pada metode yang sangat kritis diterima bahwa RSD harus lebih dari 2%.

2.6.2 Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan dengan

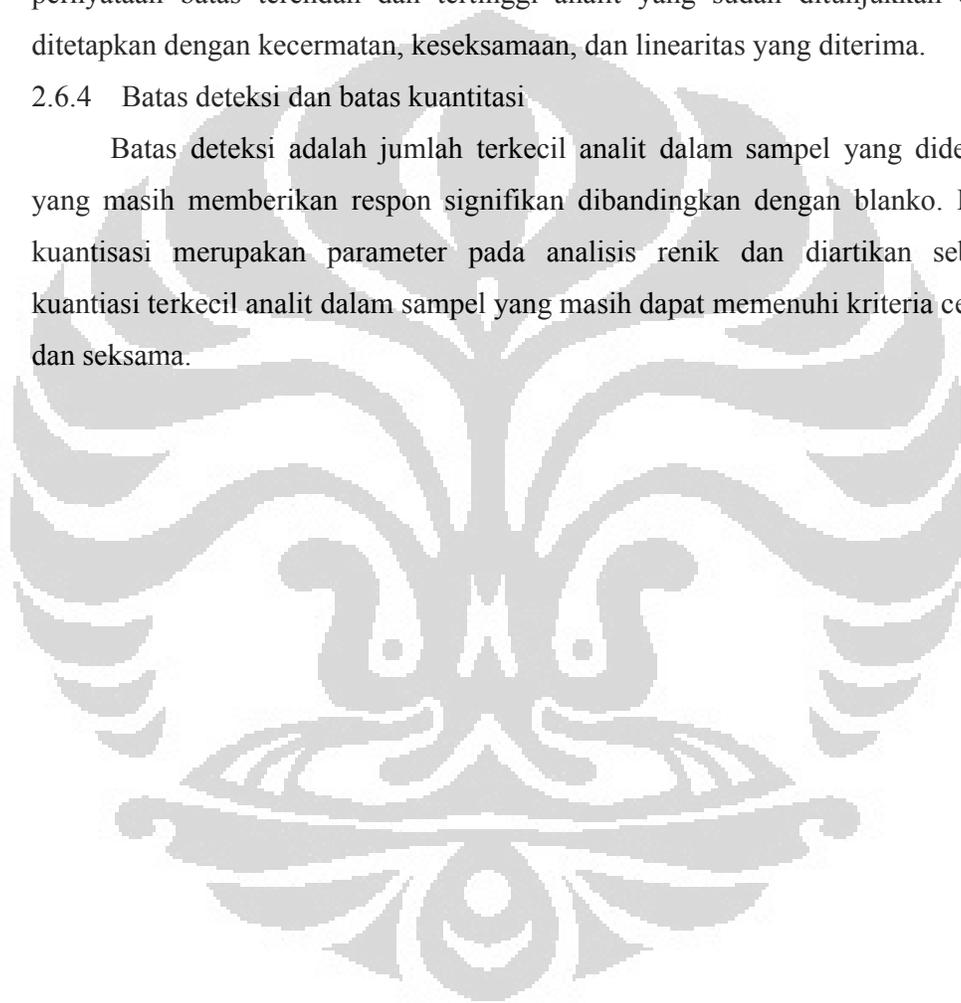
terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

2.6.3 Linieritas dan rentang

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 diterima.

2.6.4 Batas deteksi dan batas kuantitasi

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



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia, dari bulan September sampai Desember 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Densitometer (TLC Scanner 3 Camag); alat penotol (Camag Nanomat 4); mikropipet kapiler 2 μ l; *water bath*; alat-alat gelas, *chamber* KLT; lempeng KLT *silica gel* 60 F₂₅₄ (Merck, *Germany*); *freeze dryer* (Scanvac); mikropipet 100-1000 ml (Eppendorf); Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601).

3.2.2 Bahan

Sampel senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida; larutan senyawa pembanding 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida; aquadest (Brataco); tetrahidrofur (Mallinckrodt, USA); etil asetat (Mallinckrodt, USA); sikloheksan; kalium hidroksida (KOH) (Merck, *Germany*); HCl (Merck, *Germany*); es batu.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Pembuatan larutan kalium hidroksida (KOH) 1,0 M

Ditimbang lebih kurang 1,12 g kalium hidroksida, kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquadest setelah larut pindahkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi sebelumnya dengan volume 20 ml. Tambahkan aquadest hingga tanda kalibrasi.

3.3.2 Pembuatan larutan kalium hidroksida (KOH) 0,1 M

Dipipet sebanyak 2 ml larutan KOH 1 M, kemudian pindahkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi sebelumnya dengan volume 20 ml. Tambahkan aquadest hingga tanda kalibrasi.

3.3.3 Pembuatan larutan kalium hidroksida (KOH) 0,01 M

Dipipet sebanyak 2 ml larutan KOH 0,1 M, kemudian pindahkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi sebelumnya dengan volume 20 ml. Tambahkan aquadest hingga tanda kalibrasi.

3.3.4 Pembuatan Larutan HCl 1,0 M

Dilakukan pengenceran terhadap HCl (p) 11,96 M, dengan memipet sebanyak 1,67 ml HCl (p) kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi 20 ml, dan telah berisi 10 ml aquadest. Goyangkan botol hingga homogen, kemudian tambahkan aquadest hingga tanda batas.

3.3.5 Pembuatan Larutan HCl 0,1 M

Dipipet sebanyak 2 ml larutan HCl 1 M, kemudian pindahkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi sebelumnya dengan volume 20 ml. Tambahkan aquadest hingga tanda kalibrasi.

3.3.6 Pembuatan Larutan HCl 0,01 M

Dipipet sebanyak 2 ml larutan HCl 0,1 M, kemudian pindahkan ke dalam botol kaca yang telah dikalibrasi sebelumnya dengan volume 20 ml. Tambahkan aquadest hingga tanda kalibrasi.

3.3.7 Optimasi kondisi analisis secara kromatografi lapis tipis densitometri

3.3.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

Larutan sampel dengan konsentrasi lebih kurang 10 ppm, dibuat spektra serapan dengan mengukur serapan larutan tersebut pada panjang gelombang 200-400 nm. Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum.

3.3.7.2 Optimasi pemilihan fase gerak

Larutan sampel dengan konsentrasi lebih kurang 100 ppm dengan pelarut tetrahidrofur ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 120° C selama 30 menit. Ukuran lempeng 3 x 9 cm volume penotolan sebanyak 2 µl, dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah, batas elusi 1 cm dari

bagian atas dan dikembangkan sepanjang 7 cm. Kemudian lempeng dielusi menggunakan fase gerak sebagai berikut:

1. Sikloheksan-Etilasetat (3:7)
2. Tetrahidrofuran-sikloheksan-etil asetat (2,5:2,5:5)
3. Tetrahidrofuran -sikloheksan-etil asetat (3:3:4)
4. Etil asetat- tetrahidrofuran (5:5)
5. Etil asetat-sikloheksan (5:5)
6. Tetrahidrofuran -sikloheksan-etil asetat (4:2:4)
7. Etil asetat 100 %
8. Tetrahidrofuran -sikloheksan-etil asetat (2:4:4)

Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis bercak hasil elusi dianalisis dengan KLT densitometri. Eluen yang memberikan pemisahan baik yaitu dengan nilai Rf sebesar 0,2-0,8 akan digunakan pada pemeriksaan kromatografi selanjutnya.

3.3.7.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimal Dengan KLT Densitometri

Larutan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida dengan konsentrasi 300 ppm, ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 120° C selama 30 menit. Dengan ukuran lempeng 3 x 9 cm, volume penotolan 2 µl, dengan batas 1 cm dari tepi bawah, batas elusi 1 cm dari bagian atas lempeng dan dikembangkan dengan jarak 7 cm, dengan fase gerak terpilih.

Setelah pengembangan selesai, kemudian lempeng dikeringkan dengan udara hangat, dan setelahnya bercak dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner*. Pada analisis dibuat kurva serapan pada panjang gelombang yang diperoleh pada percobaan 3.3.7.1. Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum dengan melakukan *scanning* sebanyak dua kali pada *TLC Scanner*.

3.3.8 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dibuat larutan sampel dengan konsentrasi 30; 90; 150; 180; 240; 300 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng yang telah diaktifkan dengan suhu 120° C selama 30 menit. Volume penotolan sebesar 2 ul dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, jarak antar penotolan 1 cm dan batas elusi 1 cm dari bagian

atas lempeng. Kemudian lempeng dikembangkan sepanjang 7 cm dengan fase gerak terpilih.

Setelah pengembangan selesai, kemudian lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari percobaan 3.3.7.3. Diperoleh area, lalu dibuat kurva kalibrasi perbandingan antara area dengan berat bercak sehingga didapat persamaan garis $y = a + bx$.

3.3.9 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dari 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensensulfasetamida dapat dihitung dengan perhitungan statistik melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

3.3.10 Uji Keterulangan

Larutan sampel dalam pelarut tetrahidrofur dengan konsentrasi 30; 150; 300 ppm. Masing-masing konsentrasi ditotolkan sebanyak enam kali pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 120° C. selama 30 menit. Volume penotolan 2 µl dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah, jarak antar penotolan 1 cm dan dikembangkan sepanjang 7 cm pada kondisi analisis terpilih.

Setelah pengembangan selesai dilakukan lempeng KLT dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum. Kemudian catat area yang diperoleh, masukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi untuk mendapatkan kadar yang digunakan untuk menghitung koefisien variasinya. Parameter keterulangan ditentukan dengan menghitung simpangan baku dan koefisien variasi kurang dari atau sama dengan 2 %.

3.3.11 Uji Selektivitas

Larutan sampel dengan konsentrasi 300 ppm sebanyak 200 µl di masukkan ke dalam vial 5 ml, ditambahkan KOH 1M sebanyak 200 µl dipanaskan di atas *waterbath* pada suhu lebih kurang 100° C selama satu jam, kemudian didinginkan dengan es batu dan segera ditambahkan HCl 1M sebanyak 200 µl. Kemudian sampel dihilangkan airnya dengan menggunakan *freeze dryer*. Setelah sampel kering ditambahkan tetrahidrofur, lakukan sonikasi untuk memastikan senyawa larut sempurna. Larutan uji dalam tetrahidrofur kemudian ditotolkan pada

lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan pada suhu 120°C selama 30 menit. Volume penotolan $2\mu\text{l}$ dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, dengan batas elusi 1 cm dari bagian atas dan dikembangkan sepanjang 7 cm pada kondisi analisis terpilih. Setelah pengembangan selesai dilakukan lempeng KLT dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang yang diperoleh pada percobaan 3.3.7.3.

3.9.12 Uji Stabilitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida

Dibuat larutan sampel dengan konsentrasi 300 ppm. Larutan tersebut dipipet menggunakan mikropipet sebanyak $200\mu\text{l}$, dan dimasukkan ke dalam vial percobaan (54 vial, $200\mu\text{l}/\text{vial}$). Vial percobaan kemudian dikelompokkan menjadi 3 kelompok uji, tiap vial dari masing-masing kelompok uji ditambahkan larutan KOH 1; 0,1; 0,01 M sebanyak $200\mu\text{l}$. Dari tiap kelompok penambahan larutan KOH, dibagi menjadi tiga kondisi yaitu percobaan pada suhu $45^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, dan $85^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

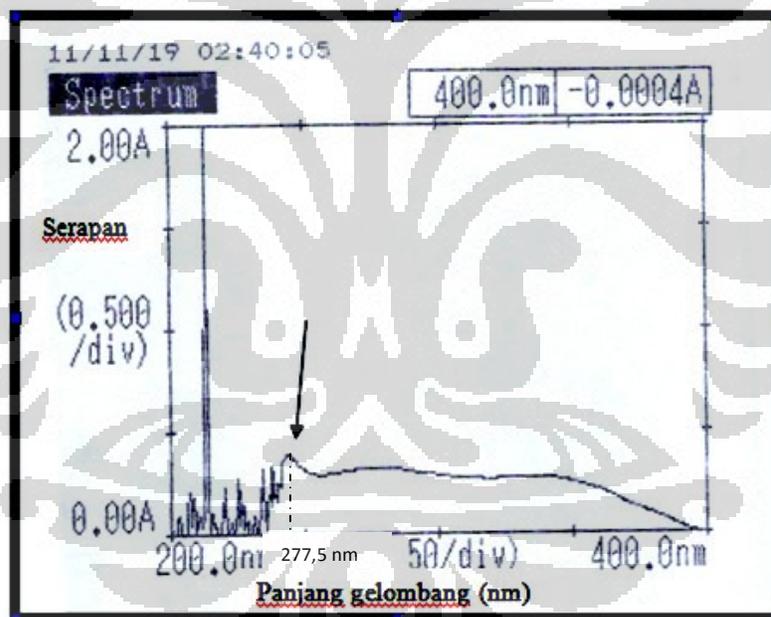
Pemanasan sampel dilakukan dalam *waterbath*. Sampel lalu ditambahkan HCl sesuai konsentrasi KOH pada larutan uji, kemudian keringkan sampel dengan *freeze dryer*, tambahkan tetrahidrofur, sonikasi larutan lalu totolkan pada lempeng KLT. Tentukan kadarnya sebagai data percobaan pada t_0 . Setelah waktu pemanasan tercapai sampel diambil dan didinginkan dengan es untuk mengurangi kecepatan reaksi, setelahnya ditambahkan $200\mu\text{l}$ HCl sesuai konsentrasi KOH pada larutan uji. Keringkan sampel menggunakan *freeze dryer*, setelah sampel kering tambahkan tetrahidrofur sebanyak $200\mu\text{l}$. Larutan uji dalam THF kemudian ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan pada suhu 120°C selama 30 menit. Volume penotolan $2\mu\text{l}$ dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, batas elusi 1 cm dari bagian atas lempeng dan dikembangkan sepanjang 7 cm pada kondisi analisis terpilih. Setelah pengembangan selesai dilakukan lempeng KLT dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang 324 nm skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 4.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Metode Analisis Menggunakan KLT Densitometri

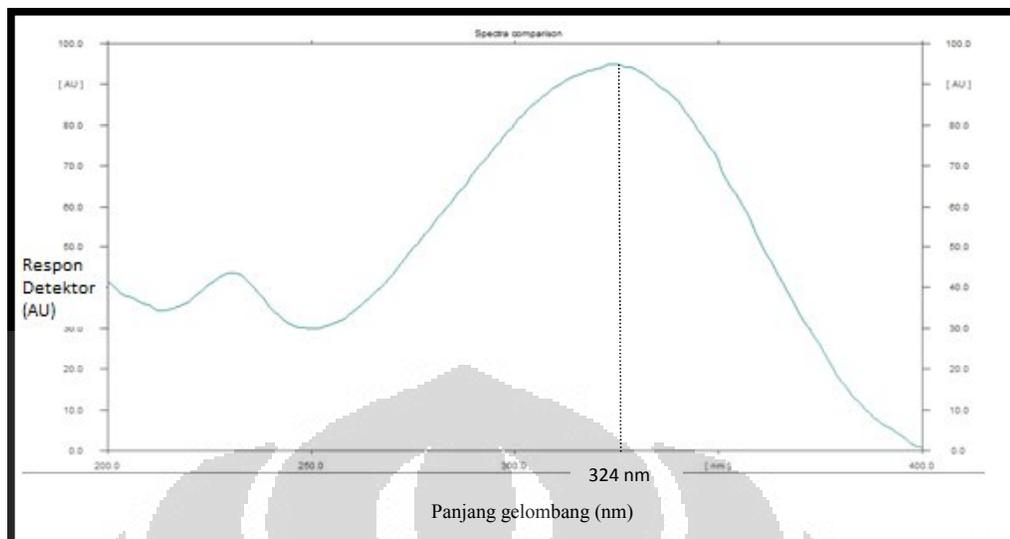
4.1.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan KLT densitometri. Untuk penentuan dengan spektrofotometer UV-Vis, larutan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dengan konsentrasi 10 ppm dalam pelarut tetrahidrofur memberikan panjang gelombang maksimal pada 277,5 nm, dan memberikan absorpsi maksimum yaitu 0,3281 AU.



Gambar 4.1 (Tanda panah) Kurva serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida 10 ppm dalam pelarut tetrahidrofur pada panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

Pengukuran panjang gelombang maksimum juga dilakukan menggunakan KLT densitometri. Pada pengukuran menggunakan instrumen tersebut dihasilkan panjang gelombang maksimum yang berbeda dengan spektrofotometer UV-Vis, yaitu sebesar 324 nm.



Gambar 4.2 Kurva serapan bercak 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida pada panjang gelombang 324 nm dengan *TLC Scanner*

Adanya perbedaan nilai panjang gelombang maksimum yang dihasilkan spektrofotometri Uv-Vis dengan KLT densitometri disebabkan adanya perbedaan kondisi analisis meliputi jenis instrument serta medium yang digunakan. Pada spektrofotometri Uv-Vis, medium analisis berupa cairan pelarut zat (tetrahidrofurana), sedangkan pada KLT densitometri medium analisis berupa zat padat, yaitu silika gel.

4.1.2 Pemilihan fase gerak

Analisis kualitatif senyawa pada penelitian ini digunakan fase gerak tetrahidrofurana-sikloheksana-etil asetat (3:3:4). Penentuan fase gerak ini didasarkan hasil optimasi pemilihan fase gerak. Digunakan 8 fase gerak, berdasarkan nilai R_f yang dihasilkan (Tabel. 4.1). Dapat dilihat berdasarkan nilai R_f yang didapat kesemua kombinasi campuran fase gerak memiliki nilai R_f antara 0,2-0,8 kecuali campuran etil asetat-tetrahidrofurana (5:5) dengan nilai R_f 0,9. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hudiyono dan Hayun, 2011, digunakan fase gerak campuran antara tetrahidrofurana-sikloheksana-etil asetat untuk melakukan analisis senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida.

Tabel 4.1 Data Rf pada beberapa macam fase gerak

No	Fase Gerak	Rf
1	Etil asetat-tetrahidrofuram (5:5)	0,90
2	Etil asetat 100 %	0,74
3	Tetrahidrofuram-sikloheksan (5:5)	0,37
4	Tetrahidrofuram-sikloheksan-etil asetat(2,5:2,5:5)	0,69
5	Tetrahidrofuram-sikloheksan-etilasetat (2:4:4)	0,39
6	Tetrahidrofuram-sikloheksan-etilasetat (3:3:4)	0,60
7	Sikloheksan-etilasetat (3:7)	0,44
8	Tetrahidrofuram-sikloheksan-etilasetat (4:2:4)	0,77

Maka selanjutnya dilakukan uji pendahuluan terhadap hasil hidrolisis, untuk melihat pemisahan yang terjadi dengan kombinasi fase gerak tetrahidrofuram-sikloheksan-etil asetat (2,5:2,5:5; 2:4:4; 3:3:4, dan 4:2:4). Dengan kondisi perlakuan sampel pada suhu 45°C selama 1 jam dengan penambahan KOH 1 M. Dari uji pendahuluan tersebut, hanya pada kombinasi campuran fase gerak tetrahidrofuram-sikloheksan-etil asetat (3:3:4) yang menunjukkan pemisahan antara hasil hidrolisis dan senyawa asal. Berdasarkan hal tersebut maka digunakanlah fase gerak berupa campuran tetrahidrofuram-sikloheksan-etil asetat (3:3:4) sebagai fase gerak terpilih.

Pergeseran nilai Rf selama percobaan. Terdapat perbedaan nilai Rf yang dihasilkan antara optimasi pemilihan fase gerak dengan hasil analisis setelah perlakuan. Pada saat optimasi dihasilkan nilai Rf untuk senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfasetamida dihasilkan nilai Rf 0,60. Sedangkan pada analisis uji stabilitas nilai Rf yang dihasilkan sebesar 0,44. Adanya pergeseran nilai Rf ini disebabkan adanya perbedaan kondisi analisis pada kedua percobaan, meliputi jumlah eluen dan ukuran bejana yang digunakan. Pengkondisian pada saat optimasi digunakan eluen sebanyak 10 ml yang disesuaikan dengan ukuran bejana KLT yaitu 5 x 5 cm. Sedangkan pada percobaan analisis setelah perlakuan digunakan eluen sebanyak 20 ml dengan ukuran bejana KLT yaitu 8 x 30 cm.

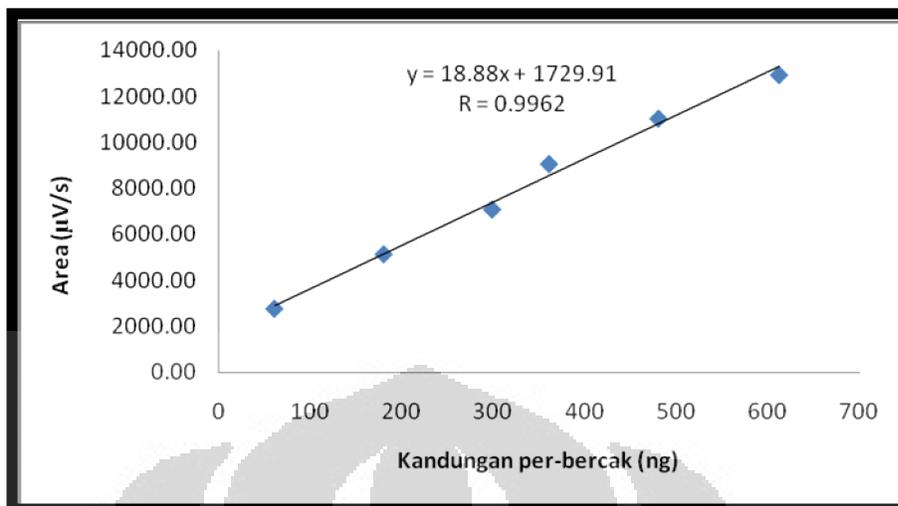
Perbedaan-perbedaan tersebut mengakibatkan adanya pergeseran nilai Rf yang dihasilkan. Hal ini disebabkan adanya perbedaan tingkat kejenuhan bejana KLT yang dapat mempengaruhi daya alir dari fase gerak serta kemampuannya dalam mengelusi. Adanya variasi tersebut menyebabkan terjadinya pergeseran nilai Rf. Fenomena tersebut merupakan masalah umum dalam penggunaan metode analisis ini, dimana perbedaan kejenuhan bejana merupakan parameter yang sulit untuk dikendalikan. Untuk mengatasi masalah tersebut maka dilakukan penotolan senyawa pembanding baik senyawa asal dan hasil degradasi pada setiap lempeng hasil pengujian stabilitas sebagai kontrol pembanding nilai Rf yang dihasilkan.

4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida

Diperoleh persamaan regresi linier kurva kalibrasi yaitu $y = 1729,91 + 18,88x$ dimana y adalah luas puncak 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida dan x adalah berat atau kandungan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril] benzensulfasetamida (ng) dan nilai regresi linier (r) yaitu 0,9962. Data kurva kalibrasi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida dapat dilihat pada Tabel 4.2. Gambar persamaan garis regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etiril]benzensulfasetamida dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Tabel 4.2 Data kurva kalibrasi

Kandungan per-bercak (ng)	Area ($\mu\text{V/s}$)
61,20	2758.80
180,54	5134.70
298,80	7082.40
361,08	9067.90
480,42	11046.20
612,00	12943.70



Gambar 4.3 Kurva kalibrasi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida

4.3 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida berturut-turut adalah 58,78 ng dan 195,92 ng. Data perhitungan batas deteksi dan batas kuantitas dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Kandungan perbercak (ng)	Area (µV/s)	Yi	(y-Yi) ²
61,20	2758,80	2885,58	16071,95
180,54	5134,70	5139,12	19,52
298,80	7082,40	7372,27	84023,39
361,08	9067,90	8548,33	269957,97
480,42	11046,20	10801,87	59697,85
612,00	12943,70	13286,54	117542,41
Jumlah			454754,70

Keterangan:

Yi = Area berdasarkan persamaan regresi (µV/s)
y = Area yang dihasilkan dari respon detektor (µV/s)
S(y/x) = 369,90
Batas deteksi = 58,78 ng
Batas kuantitasi = 195,92 ng

4.4 Uji Keterulangan

Hasil pengujian keterulangan dari 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensensulfasetamida memiliki nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi 61,20 ng dan 612,00 ng kurang dari 2 %, sedangkan pada konsentrasi 298,80 ng nilainya adalah 2,04 % . Data uji keterulangan dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil perhitungan uji presisi

Kandungan perbercak (ng)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Simpangan Deviasi (SD)	Koefisien Variasi (%) (KV)
61,20	2751,30	0,82	1,52
	2752,60		
	2758,80		
	2765,30		
	2729,40		
	2722,50		
298,80	7235,10	5,89	2,06
	7316,20		
	7019,60		
	7014,10		
	7088,40		
	7093,10		
612,00	11775,60	7,72	1,43
	11855,30		
	11960,80		
	11864,80		
	11832,80		
	12220,20		

Keterangan:

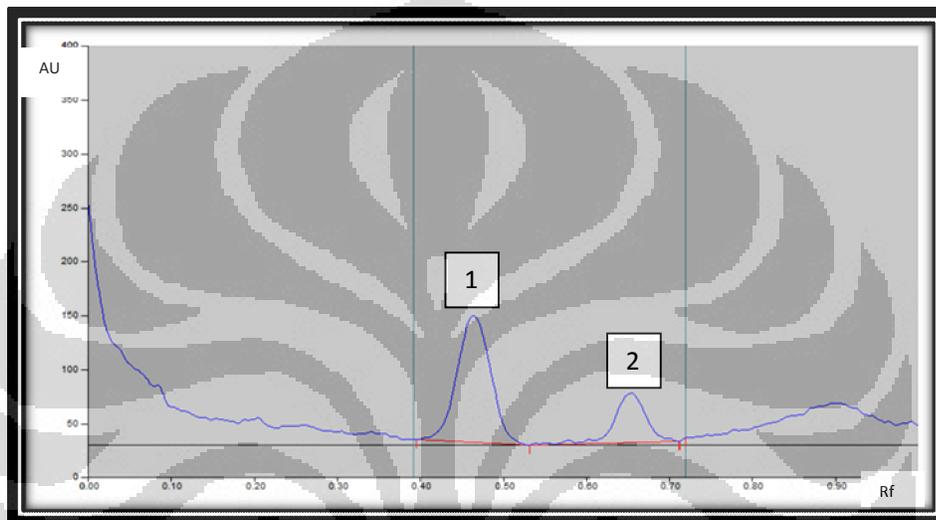
Kondisi analisis, fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etil asetat (3:3:4); volume penotolan 2 μl ; panjang gelombang 324 nm.

Dari hasil perlakuan uji keterulangan dihasilkan nilai %KV untuk kandungan perbercak sebesar 61,20 ng dan 612,00 ng kurang dari 2 % dan untuk nilai %KV pada konsentrasi 298,80 ng dengan nilai 2,06 %. Penyimpangan nilai %KV pada konsentrasi 298,80 ng dapat disebabkan karena kurangnya kemampuan peneliti dalam melakukan penotolan sampel, atau dapat juga

disebabkan alat penotol yang tidak dikalibrasi secara berkala, sehingga memberikan penyimpangan tersebut.

4.5 Uji Selektivitas

Hasil kurva densitas dari pengujian selektivitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kurva densitas selektivitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida dengan fase gerak tetrahidrofuransikloheksan-etil asetat (3:3:4) pada 324 nm. Puncak 1 menunjukkan senyawa dengan gugus asetil, dan puncak 2 menunjukkan hasil urainya.

Pada kurva densitas selektivitas didapat dua puncak berdasarkan nilai Rf yang dibandingkan dengan senyawa tanpa gugus asetil dimana puncak 1 = 0,44 menunjukkan senyawa asal, dan puncak 2 = 0,61 menunjukkan senyawa tanpa gugus asetil hasil hidrolisis. Berdasarkan data tersebut, metode yang digunakan bersifat selektif, dimana senyawa hasil hidrolisis dan senyawa asal memberikan nilai Rf yang berbeda.

4.6 Uji Stabilitas

Uji stabilitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida diawali dengan menentukan metode analisis menggunakan kromatografi lapis tipis fase normal. Sesuai tujuan penelitian untuk membuktikan

apakah dengan penambahan larutan KOH, akan dapat menghidrolisis senyawa uji menjadi bentuk tanpa gugus asetil dengan perbedaan polaritas dengan senyawa asal. Sulfasetamid sendiri termasuk golongan senyawa amida, yang memiliki suatu nitrogen trivalen yang terikat pada satu gugus karbonil. Amida sendiri dapat terhidrolisis baik dalam larutan asam maupun basa. Kedua macam reaksi hidrolisis ini bersifat tidak reversibel.

Senyawa dengan gugus asetil memiliki waktu penambatan yang lebih lama pada lempeng KLT yang bersifat polar, sehingga dapat dipisahkan senyawa hasil hidrolisis dan senyawa asal dalam analisisnya. Pengamatan terhadap kestabilan gugus sulfasetamid juga telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Ahmad dan Iqbal 1988). Pada penelitian tersebut sampel uji berupa sulfasetamid dalam larutan dapar fosfat pH 7,0 dengan perlakuan pemanasan suhu 90°C selama 0; 50; 100; 150; 200; 250, dan 300 jam. Sedangkan pada penelitian ini sampel uji merupakan senyawa 4 - [(E) - 2 - {4- okso -3-(4-metoksifenil) - kuinazolin - 2 - il } etinil]benzensulfasetamida yang memiliki struktur kimia lebih kompleks, dengan perlakuan dalam larutan KOH 1; 0,1 dan 0,01 M dengan perlakuan tiga suhu yaitu 45°, 65°, dan 85° C selama 0; 1; 3; 6; 9; 24 jam.

Dilakukannya penelitian pada kondisi tersebut didasari pada senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil] benzensulfasetamida yang belum diketahui sifat kelarutannya dalam dapar fosfat. Namun telah diketahui senyawa uji memiliki kelarutan dalam larutan basa. Selain itu adanya pustaka (Vogel, 1958) yang menyebutkan bahwa penambahan KOH sebanyak 5% dengan pemanasan 100°C selama satu jam pada sulfasetamid akan dapat menghidrolisis gugus asetilnya. Dari dua hal tersebut maka digunakan kondisi penambahan larutan KOH dalam menentukan stabilitas 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]benzensulfasetamida.

Analisis hasil pemisahan yang dilakukan juga berbeda dengan penelitian sebelumnya (Ahmad dan Iqbal, 1988). Pada penelitian sebelumnya digunakan analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan analisis kualitatif menggunakan sistem KLT, dengan lempeng KLT silica gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak etanol-metanol (50:50) yang dihasilkan nilai R_f sulfanilamid 0,83. Analisis senyawa 4 - [(E) - 2 - {4 - okso - 3 - (4 - metoksifenil) - kuinazolin-2-il}etinil]

benzensulfasetamida tidak dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis, hal ini dikarenakan larutan zat dalam tetrahidrofur yang dibutuhkan untuk analisis dengan spektrofotometri UV-Vis relatif lebih banyak sehingga metode tersebut kurang memadai untuk diaplikasikan dalam penelitian ini, dikarenakan keterbatasan volume larutan uji yang hanya sebesar 200 μ l. Selain itu juga akan sulit untuk membuat larutan uji hasil degradasi menjadi jernih, karena adanya garam KCl hasil reaksi antara KOH dengan HCl dalam pengujian yang tidak larut dalam tetrahidrofur. Berdasarkan hal-hal tersebut akhirnya digunakan metode analisis dengan KLT densitometri. Metode ini digunakan karena lebih efisien dalam pembuatan larutan sampel dengan volume kecil.

Tabel 4.5 Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 1M

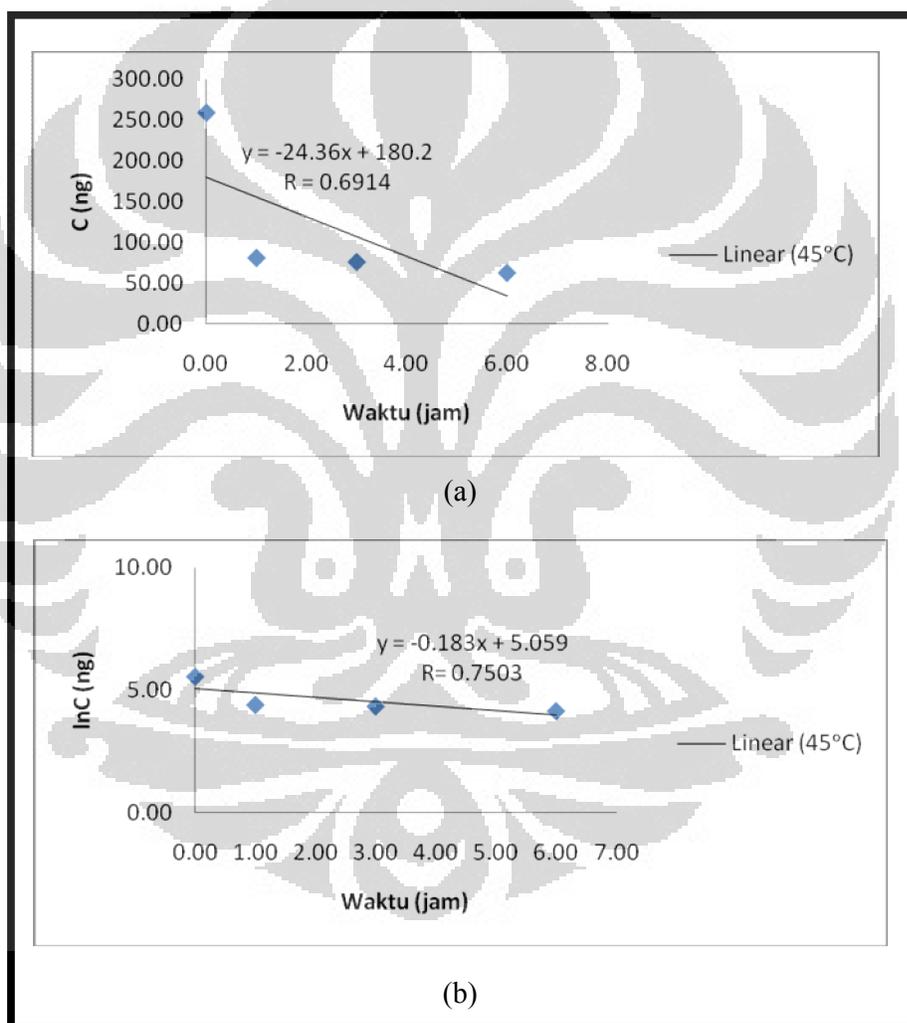
Suhu °C	45			65			85		
Waktu (jam)	Area (μ V/s)	C(ng)	ln C	Area (μ V/s)	C(ng)	ln C	Area (μ V/s)	C(ng)	ln C
0,00	6615,00	258,70	5,56	6615,00	258,70	5,56	6615,00	258,70	5,56
1,00	3253,00	80,66*	4,39	3513,00	94,43*	4,55	-	-	-
3,00	3159,30	75,70*	4,33	-	-	-	-	-	-
6,00	2906,90	62,33*	4,13	-	-	-	-	-	-
9,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

C = kandungan per bercak ; * = Konsentrasi di bawah batas kuantitasi 195,92 ng .

Tabel 4.5 menunjukkan data hasil uji stabilitas. Dari data tersebut kemudian dapat ditentukan orde reaksi laju degradasi dari senyawa dengan membuat kurva regresi linear hubungan antara waktu terhadap konsentrasi (C) serta waktu terhadap ln konsentrasi (lnC). Dari ke dua kurva kemudian ditentukan nilai koefisien korelasi (r). kurva yang menunjukkan nilai koefisien korelasi (r) lebih besar menunjukkan orde reaksi degradasi dari senyawa. Dimana kurva regresi linear hubungan antara waktu terhadap konsentrasi (C) menunjukkan orde 0 serta waktu terhadap ln konsentrasi (lnC) menunjukkan orde 1. Pada konsentrasi penambahan KOH 1 M, hanya dapat ditentukan orde reaksi pada suhu percobaan 45°C, dan tidak pada suhu 65° dan 85°C. Hal tersebut disebabkan pada dua kondisi tersebut 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]

benzensulfasetamida telah rusak menjadi senyawa lain yang tidak diketahui sehingga tidak terdeteksi. Dari hasil tersebut, dapat dibuktikan penambahan KOH 1M tidak hanya menghidrolisis gugus sulfasetamid, tetapi juga gugus lain dari senyawa uji. Pada data dengan penambahan larutan KOH 1 M suhu 45° C di jam ke 1, 3 dan 6 serta 65° C di jam ke 1 dihasilkan konsentrasi di bawah batas kuantitasi yaitu 195,92 ng. Namun kandungan sampel pada bercak masih dapat dihitung kadarnya tetapi dengan tingkat akurasi yang rendah.



Gambar 4.5 Kurva regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfasetamida dalam KOH 1M suhu 45° C, (a) hubungan antara C (kandungan per bercak) terhadap waktu; (b) hubungan antara ln C (ln kandungan perbercak) terhadap waktu.

Dapat dilihat pada Gambar 4.5 setelah dibuat kurva regresi linier hubungan antara waktu terhadap konsentrasi (C) dan ln konsentrasi (ln C) berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) yang dihasilkan, diketahui kurva hubungan waktu terhadap ln konsentrasi memiliki nilai koefisien korelasi (r) lebih besar yaitu 0,7503, dibandingkan dengan nilai koefisien korelasi (r) kurva hubungan waktu terhadap konsentrasi, yaitu 0,6914. Hal tersebut menunjukkan laju degradasi perlakuan penambahan KOH konsentrasi 1 M pada suhu 45°C mengikuti orde 1. Namun karena hanya dihasilkan 1 persamaan garis, maka untuk perlakuan suhu 65° dan 85°C tidak dapat ditentukan orde reaksi serta konstanta laju degradasi senyawa. Hal tersebut menyebabkan pada penambahan KOH 1M tidak dapat ditentukannya nilai k, Ea (energi aktivasi), $t_{1/2}$, t_{90} pada suhu 25°C sebagai parameter pembanding kestabilan antara masing-masing konsentrasi KOH.

Tabel 4.6 Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 0,1 M

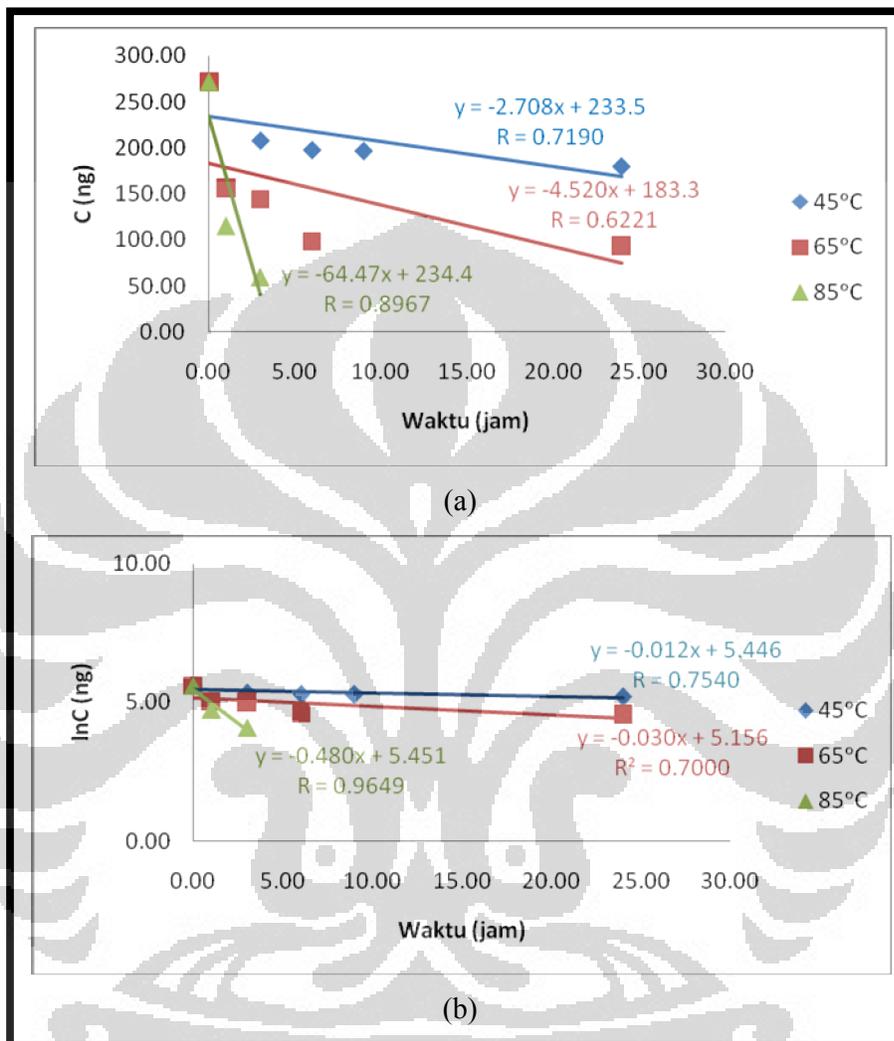
Suhu °C	45			65			85			
	Waktu (jam)	Area (µV/s)	C(ng)	ln C	Area (µV/s)	C(ng)	ln C	Area (µV/s)	C(ng)	ln C
	0,00	6851,10	271,20	5,60	6851,10	271,20	5,60	6851,10	271,20	5,60
	1,00	NVD	NVD	NVD	4678,80	156,16*	5,05	3899,80	114,91*	4,74
	3,00	5656,60	207,94	5,34	4447,00	143,89*	4,97	2852,00	59,42*	4,08
	6,00	5466,20	197,86	5,29	3586,20	98,30*	4,59	-	-	-
	9,00	5447,60	196,88	5,28	NVD	NVD	NVD	-	-	-
	24,00	5133,60	180,25*	5,19	3496,10	93,53*	4,54	-	-	-

Keterangan :

C = kandungan per bercak; NVD = *Not Valid Data*; *= Kadar berada di bawah nilai LOQ (195,92 ng)

Dari hasil analisis yang ditunjukkan Tabel 4.6 pada kondisi perlakuan sampel dengan penambahan larutan KOH 0,1 M di suhu 45° C pada jam ke 24; suhu 65° C pada jam ke 1-24 dan 85° C pada jam ke 1-3 dihasilkan konsentrasi di bawah LOQ, sehingga kadar yang ditentukan tidak akurat, hal ini dikarenakan reaksi hidrolisis yang terjadi tidak dapat diperkirakan, sehingga sensitifitas alat tidak dapat dipaksakan. Diketahui orde reaksi reaksi degradasi pada kondisi ini mengikuti orde 1. Penentuan orde reaksi ini didasarkan pada pembuatan kurva

regresi linier hubungan antara waktu dan konsentrasi (C) serta waktu dan ln konsentrasi (ln C).



Gambar 4.6 Kurva regresi linear 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensensulfasetamida dalam KOH 0,1M suhu 45°, 65°, dan 85°C; (a) hubungan antara C (kandungan per bercak) terhadap waktu; (b) hubungan antara ln C (ln kandungan perbercak) terhadap waktu

Dari gambar terlihat bahwa nilai koefisien korelasi (r) hubungan waktu terhadap ln konsentrasi memiliki nilai yang lebih besar, sehingga ditentukan tetapan kecepatan degradasi (k) mengikuti orde 1. Nilai tetapan laju degradasi pada tiap suhu adalah *slope* dari persamaan regresi linier hubungan antara ln C

terhadap waktu. Besarnya tetapan kecepatan degradasi (k) pada konsentrasi KOH 0,1 M dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Data hasil analisis regresi linier dari data uji stabilitas pada suhu 45°, 65°, dan 85° C dalam larutan KOH 0,1M

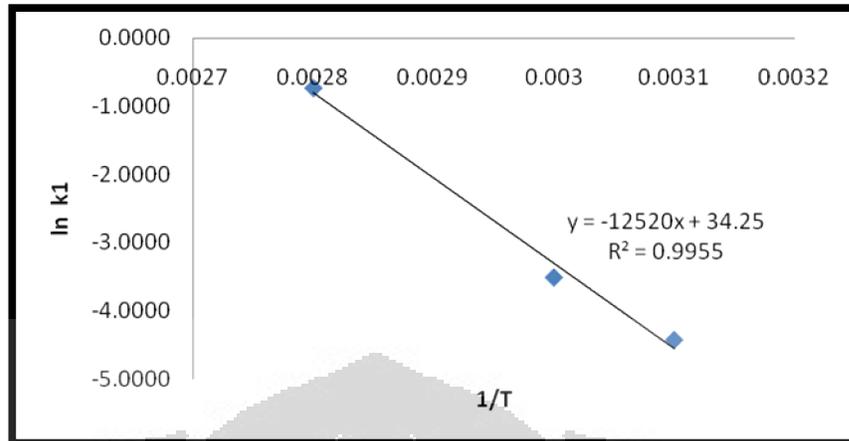
Hubungan antara C dengan waktu				Hubungan antara ln C dengan waktu		
Suhu °C	Persamaan	r	k_0	Persamaan	R	k_1
45	$y = -2,708x + 233,5$	0,7190	2,708	$y = -0,012x + 5,446$	0,7540	0,012
65	$y = -4,520x + 183,3$	0,6221	4,520	$y = -0,030x + 5,156$	0,7000	0,030
85	$y = -64,47x + 234,4$	0,8967	64,470	$y = -0,480x + 5,451$	0,9649	0,480

Keterangan = k_0 = tetapan kecepatan degradasi orde 0
 k_1 = tetapan kecepatan degradasi orde 1
 r = koefisien korelasi

Untuk mendapatkan k_1 pada suhu 25° C diperoleh dengan melakukan analisis regresi linear hubungan ln k_1 dengan 1/T, hasil analisis hubungan ln k_1 dengan 1/T dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Data hasil perhitungan tetapan kecepatan degradasi (k) KOH 0,1 M pada suhu 45°, 65°, 85 °C

Suhu °C	T(°K)	1/T (°K ⁻¹)	k_1	ln k_1
45	318	0,0031	0,0120	-4,4228
65	338	0,0030	0,0300	-3,5066
85	358	0,0028	0,4800	-0,7339



Gambar 4.7 Kurva regresi linier 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensensulfasetamida pada kondisi penambahan KOH 0,1 M, hubungan antara $\ln k_1$ terhadap $1/T$.

Dari kurva hubungan $\log k_1$ dan $1/T$ (Gambar 4.7) didapat persamaan:

$$\log k_1 = -12520 \frac{1}{T} + 34,52 \quad (4.10)$$

Keterangan :

k_1 = tetapan kecepatan degradasi orde satu (jam^{-1})

T = suhu mutlak ($^{\circ}\text{K}$)

Maka nilai k_1 pada suhu 25°C :

$$\ln k_1 = -12520 \times \frac{1}{298^{\circ}\text{K}} + 34,52$$

$$k_1 = 5,6 \times 10^{-4} \text{ jam}^{-1}$$

Untuk mengetahui energi aktivasi pada suhu 25°C digunakan persamaan:

$$b = -\frac{E_a}{R} \quad (4.11)$$

Keterangan:

b = nilai slope

E_a = energi aktivasi

R = tetapan gas, yaitu $1,987 \text{ kal}/^{\circ}\text{K mol}$

k_1 = tetapan kecepatan degradasi pada suhu 25°C

$$b = -\frac{E_a}{R}$$

$$-12520 = -\frac{E_a}{1,987}$$

$$E_a = 24877,24 \text{ kal mol}^{-1}$$

$$E_a = 24,88 \text{ kkal mol}^{-1}$$

Dari nilai k_1 pada suhu 25°C dapat diketahui nilai $t_{1/2}$ orde 1 menggunakan persamaan:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_1} \quad (4.12)$$

$$t_{1/2} = 0,693 / 0,00056 \text{ jam}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 1237,5 \text{ jam} \approx 51,56 \text{ hari}$$

Untuk menentukan waktu daluarsa (t_{90}) orde satu digunakan persamaan:

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (4.13)$$

Keterangan:

C = Konsentrasi yang ingin diketahui

C_0 = Konsentrasi mula-mula

k = Tetapan kecepatan degradasi (jam^{-1})

t = Waktu berjalannya reaksi

$$C = C_0 e^{-kt}$$

$$0,9 = 1 e^{-0,00056 \cdot t}$$

$$-0,1 = -0,00056 \cdot t$$

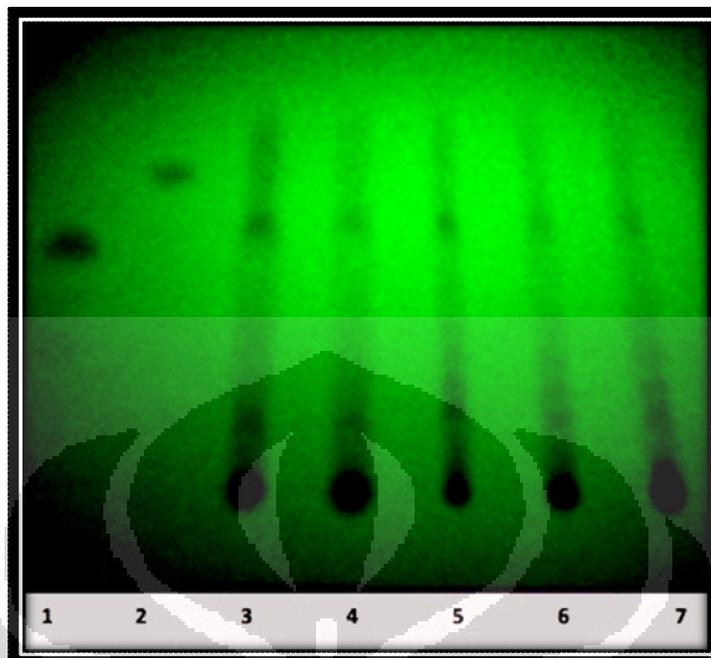
$$t_{90} = 178,57 \text{ jam}$$

$$= 178,57 \text{ jam} \approx 6,6 \text{ hari}$$

Dari hasil analisis tersebut diperoleh persamaan $\ln k_1 = -12520 / T + 34,25$ untuk konsentrasi KOH 0,1M. Kurva regresi linear $\ln k_1$ terhadap $1/T$ dapat dilihat pada Gambar 4.7. Dengan persamaan tersebut dapat dihitung besarnya k_1 pada suhu 25°C (suhu kamar), E_a (energi aktivasi), $t_{1/2}$ (waktu paruh), serta t_{90} (*self life*) atau waktu daluarsa, adapun hasil perhitungannya adalah sebagai

berikut: pada kondisi penambahan larutan KOH 0,1 M suhu 25 °C memiliki nilai $k_1 = 5,6 \times 10^{-4} \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 24,88 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 6,6 hari dan waktu paruh ($t_{1/2}$) = 51,56 hari.

Secara analisis kualitatif, berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa sulfasetamid dapat terhidrolisis menjadi sulfanilamid, hal ini sesuai dengan hasil yang ditemukan dari hasil penelitian, bahwa gugus asetil dari 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil] benzensulfasetamida (R_f 0,44), dapat terhidrolisis menjadi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfonamida (R_f 0,61) sesuai dengan nilai R_f yang didapat dan disesuaikan dengan nilai R_f pembanding. Selain itu berdasarkan penelitian-penelitian lain menyebutkan bahwa dengan adanya reaksi hidrolisis gugus sulfasetamid akan terurai menjadi sulfanilamid, yang merupakan sulfasetamid tanpa gugus asetil. (Ahmad, 1988; Gruber, 1968; Meakin, 1971). Selain sulfanilamide, disebutkan bahwa dari hasil hidrolisis sulfasetamid dapat dihasilkan senyawa-senyawa lain seperti *sulphanilic acid*, *azobenzene-4*, *4-sulphonamide*, *azoxybenzene-4*, *4-disulphonamide*, (Ahmad, 1978). Hal tersebut mungkin dapat menjelaskan tentang kondisi hasil elusi lempeng KLT yang telah ditotolkan sampel hasil hidrolisis yang tampak dengan banyak bercak seperti yang ditunjukkan Gambar 4. 8.



Keterangan:

- 1 = 4-[(E)-2-(4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il)etiril] benzensulfasetamida
- 2 = 4-[(E)-2-(4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il)etiril] benzensulfonamida
- 3 = Perlakuan sampel 1 jam
- 4 = Perlakuan sampel 3 jam
- 5 = Perlakuan sampel 6 jam
- 6 = Perlakuan sampel 9 jam
- 7 = Perlakuan sampel 24 jam

Gambar 4.8 Hasil elusi lempeng silica gel 60 F₂₅₄ yang dilihat pada panjang gelombang 254 nm menggunakan fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etilasetat (3:3:4) perlakuan sampel pada suhu 45°C dengan penambahan KOH 0,1M

Tabel 4.9 Data hasil uji stabilitas pada larutan KOH 0,01 M*

Suhu °C	45			65			85		
Waktu (jam)	Area (µV/s)	C(ng)	ln C	Area (µV/s)	C(ng)	ln C	Area (µV/s)	C(ng)	ln C
0,00	9150,30	392,96	5,97	9150,30	392,96	5,97	9150,30	392,96	5,97
1,00	8717,90	370,06	5,91	8094,80	337,06	5,82	8306,40	348,27	5,85
3,00	7275,00	293,65	5,68	7275,00	293,65	5,68	6639,50	259,97	5,56
6,00	8652,70	366,61	5,90	9793,80	427,04	6,06	6935,20	275,65	5,62
9,00	9270,80	399,34	5,99	9498,30	411,39	6,02	8072,10	335,86	5,82
24,00	9516,00	412,32	6,02	10403,70	459,33	6,13	6300,90	242,06	5,49

Keterangan :

C : kandungan per bercak; * = NVD (*Not Valid Data*)

Perlakuan penambahan KOH konsentrasi 0,01 M tidak dilakukannya pengolahan data lebih lanjut dikarenakan dihasilkan data yang fluktuatif, sehingga diragukan keakuratannya. Seperti dapat dilihat pada Tabel 4.9. Data tersebut dihasilkannya data yang fluktuatif disebabkan kelarutan zat uji dalam KOH 0,01 M yang relatif rendah dibandingkan dengan dua konsentrasi lainnya. Sehingga ketidaklarutan senyawa dalam larutan uji menyebabkan reaksi degradasi tidak dapat berjalan dengan baik.

Dari ketiga konsentrasi, larutan KOH yang dapat diukur parameter stabilitasnya meliputi k_1 pada suhu 25°C (suhu kamar), E_a (energi aktivasi), $t_{1/2}$ (waktu paruh), serta t_{90} (*self life*), hanya pada konsentrasi 0,1 M.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfasetamida secara kromatografi lapis tipis densitometri menggunakan fase diam yaitu lempeng silica gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etil asetat (3:3:4) pada panjang gelombang maksimal 324 nm.
2. Penambahan KOH dapat menghidrolisis gugus asetil senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfasetamida (Rf: 0,44) menjadi 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfonamida (Rf: 0,61)
3. Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil] benzensulfasetamida pada suhu 25° C konsentrasi KOH 0,1 M memiliki nilai $k_1 = 5,6 \times 10^{-4} \text{ jam}^{-1}$, energi aktivasi (E_a) = 24,88 kkal mol⁻¹, *shelf life* (t_{90}) = 6,6 hari dan waktu paruh ($t_{1/2}$) = 51,56 hari.

5.2 Saran

1. Dapat dilakukan pengembangan metode sintesis senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfonamida lewat hidrolisis senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil] benzensulfasetamida dengan konsentrasi KOH antara 0,1- 1M dengan suhu dan waktu tertentu.
2. Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk melakukan pengembangan metode analisis lain yang lebih sensitif dan akurat dalam analisis senyawa ini.

DAFTAR ACUAN

- Ahmad, Tauqir. 1978. *Studies on The Stability of Sulphacetamide and Degradation Product*. Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Karachi, Karachi. Pakistan. (427)
- Ahmad, Tauqir dan Iqbal Ahmad. 1988. *Stability Indicating Assay of Sulphacetamide in Thermal Degraded Solutions*. Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Karachi, Karachi. Pakistan. (83-85)
- Attwood, David dan Alexander T. Florence. 2008. *Physical Pharmacy*. UK: Pharmaceutical Press. (29-32)
- Chang, Raymond. 2004. *Kimia Dasar Konsep-Konsep Inti Edisi Ketiga Jilid 2*. Jakarta: Erlangga. (29-57)
- Corruzi. Gabriella, Nicola. Venturi, Silvana, Spaggiari. 2007. *Gastrointestinal Safety Of Novel Nonsteroidal Antiinflamantory Drugs: Selective COX-2 Inhibitors and Beyond*. Department of Human Anatomy, Pharmacology and Forensic Medicine, Section of Pharmacology, University of Parma, Parma, Published by Acta Biomed. Italy. (96-101)
- Deinstrop, Hahn, Elke. 2007. *Applied Thin Layer Chromatography; Best Practice and Avoidance of Mistaker; Second, Revised and Enlarged Edition*. Diterjemahkan dari *Applied Thin Layer Chromatography; Best Practice and Avoidance of Mistaker; Second, Revised and Enlarged Edition* Oleh R.G. Leach Weinheim. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA. Germany. (43)
- Fessenden, J. Ralph dan Joan, S. Fessenden. 1982. *Kimia Organik Jilid 2 Edisi Ketiga* (Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Penerjemah). Penerbit Erlangg, Jakarta. (137-138)
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. (353-375)
- Gruber, P. Murray dan Robert, W. Klein. 1968. *TLC Determination of Sulfanilamide as a Degradation Product in Pharmaceutical Preparations Containing Sodium Sulfacetamide*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.2600570728/abstract>. Diunduh tanggal 29 Januari 2011.

- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. (144-175)
- Hudiyono, Sumi . dan Hayun. 2011. Laporan Penelitian Hibah Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia. (6-36)
- Hayun. 2011. Komunikasi pribadi.
- Hayun *et.al.* 2011. *Virtual Screening of 2,3-disubstituted-4(3H)-quinazolinones possessing benzenesulfonamide moiety for COX-2 inhibitor*, *Bioinformation*, 7(5).(246-250)
- Kurumbail, R.G. *et al.* 1996. *Structural Basis For Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflamantory Agents*, *Nature*, 384 (19/26). (644-648)
- Lachman, *et al.*, 1994. *Praktek Farmasi Industri Edisi 3* diterjemahkan dari *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* oleh Siti Suyatmi. Jakarta : UI Press. (1516-1522)
- Martin, *et al.* 1993. *Farmasi Fisik edisi 2* diterjemahkan dari *Physical Pharmacy*, oleh Yoshita. Jakarta: UI Press. (724-779)
- Meakin. B. J., I. P Tansey dan D. J. G. Davies. 1971. *The Effect of Heat, pH and Some Buffer Materials on the Hydrolytic Degradation of Sulphacetamide in Aqueous Solution*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1971/abstract>. Diunduh tanggal 29 Januari 2011.
- Mulja, Muhammad., & Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press. (223-235)
- Oetari, R.A., Yuwono, T., 2004. *Stabilitas PGV-0 (Pentagamavunon-0) sebagai Obat Antiinflamasi dalam bentuk sediaan larutan Cair*, *Majalah Farmasi Indonesia*. Universitas Gajah Mada, 15(1).(20-24)
- Rogers, Dexter. 1979. *Thin Layer Chromatography Quantitative Environmental and Clinical Applications*. John Wiley & Sons. New York. (36-39)
- Rohman, Abdul. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Graha Ilmu Yogyakarta. (45-54)

Shargel, L., & A.B.C. Yu. 2005. *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan* (Edisi kedua). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (Fasich, S. Sjamsiah, Penerjemah). Airlangga University Press, Surabaya. (21-26)

Stahl, Egon. 1969. *Thin Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag Berlin. New York. (132-135)

Syarif, Amir *et al.* 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia. Jakarta. (230-232)

Vogel, Arthur, I. 1958. *Vogel Practical Organic Chemistry Including Quantitative Organic Analysis Third Edition*. London Longmans. (554-555)





Lampiran 1. Cara perhitungan kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapat persamaan :

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

y = Luas puncak / area

x = Berat (ng)

a = Nilai intersep

b = Nilai slope

r = Koefisien korelasi

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

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (4.1)$$

$$b = \frac{N(\sum xi \cdot yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (4.2)$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[(N\sum x^2) - (\sum x)^2][(N\sum y^2) - (\sum y)^2]}} \quad (4.3)$$

Lampiran 2. Cara perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Rumus :

$$s\left(\frac{y}{x}\right) = \sqrt{\frac{(\sum(y - y_i))^2}{n - 2}} \quad (4.4)$$

Batas deteksi : $LOD = \frac{3 s (y/x)}{b}$ (4.5)

Batas kuantitasi : $LOQ = \frac{10 s (y/x)}{b}$ (4.6)

Keterangan :

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

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

y = Luas puncak yang diperoleh ($\mu V/s$)

y_i = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi ($\mu V/s$)

n = Jumlah data

Lampiran 3. Cara perhitungan simpangan deviasi dan koefisien variasi

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

$$\text{Rata-rata} = \bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (4.7)$$

$$\text{Simpangan baku} = SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4.8)$$

$$\text{Koefisien variasi} = KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (4.9)$$

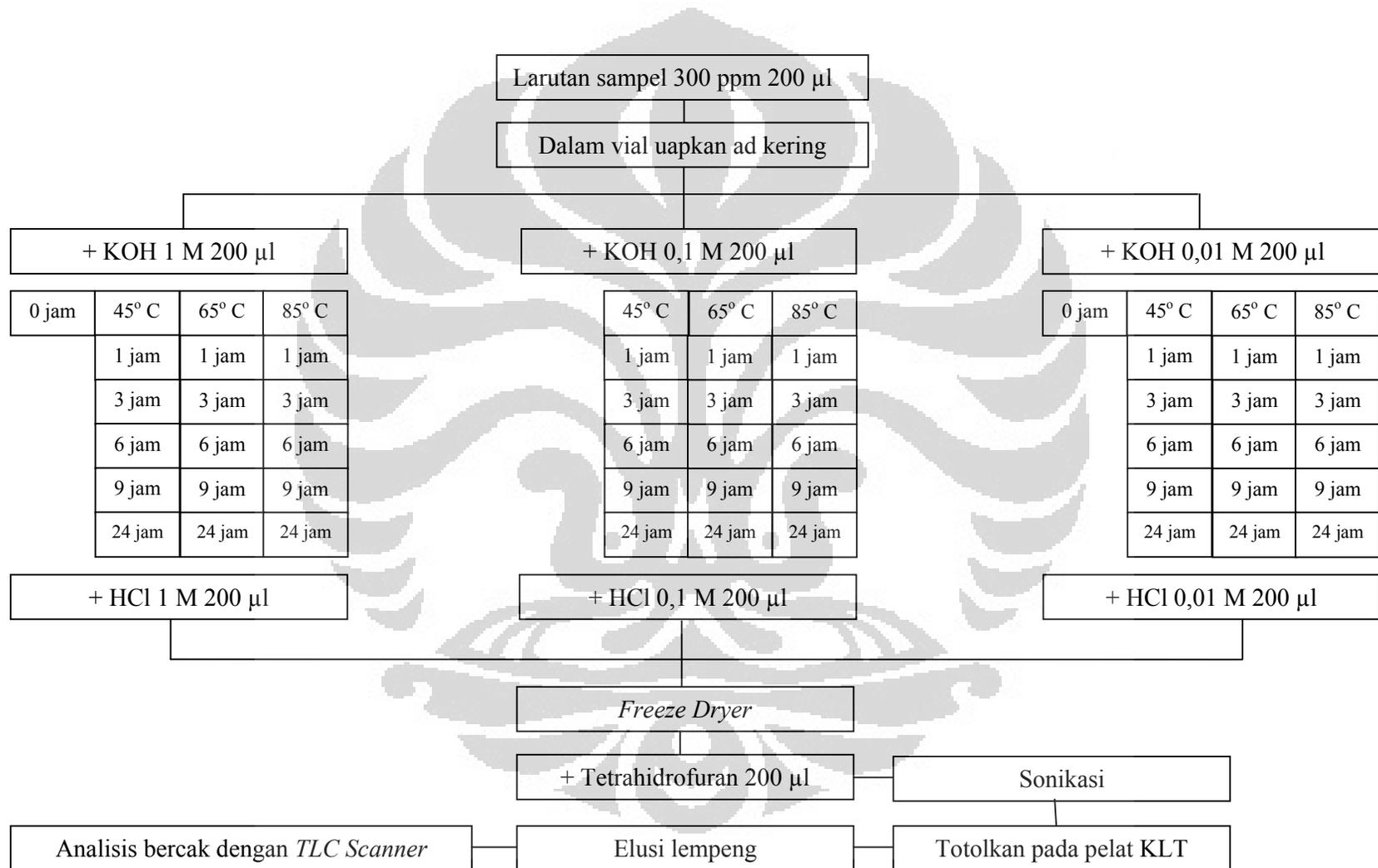
Keterangan :

x = Area / luas puncak ($\mu\text{V/s}$)

\bar{x} = Area / luas puncak rata-rata ($\mu\text{V/s}$)

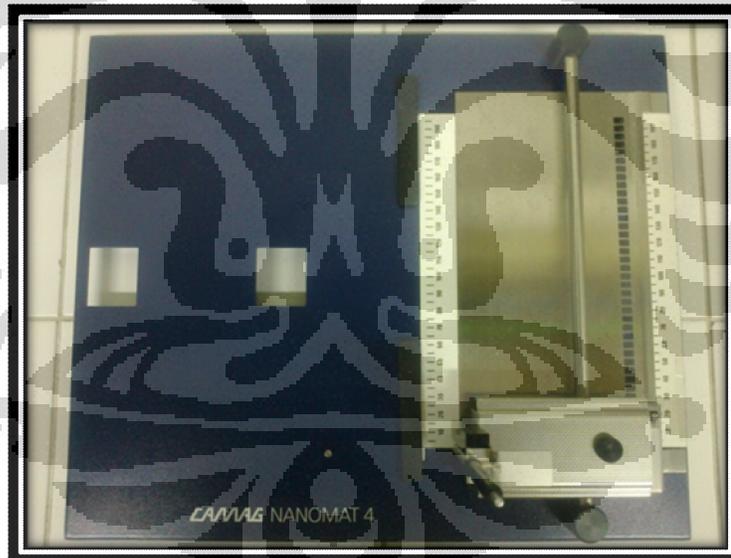
n = Jumlah data

Lampiran 4. Skema kerja uji stabilitas



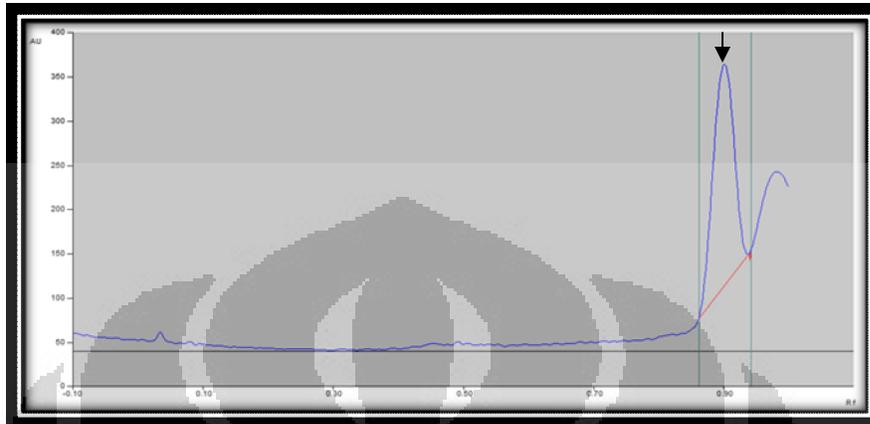
Lampiran 5. Gambar Alat-alat

Gambar alat *TLC scanner* dan komputer yang dilengkapi dengan program *wincats*. A: CPU; B: layar komputer; C: Camag *TLC Scanner 3*.

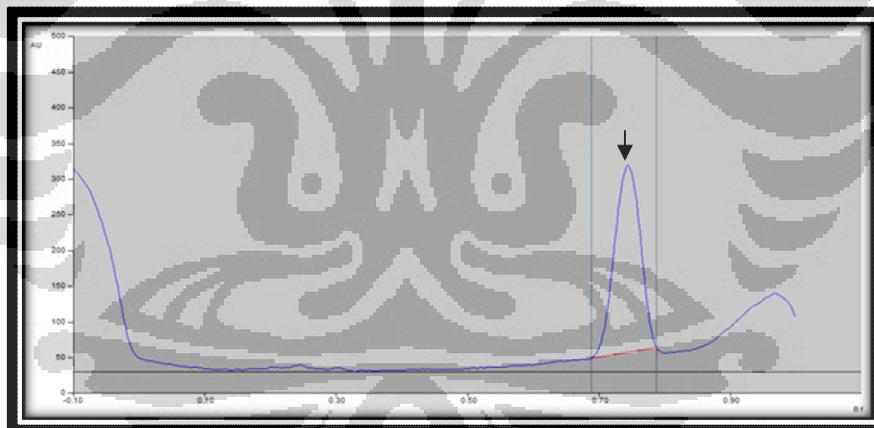


Gambar alat penotol sampel Camag NANOMAT

Lampiran 6. Kurva densitas serapan pada optimasi pemilihan fase gerak

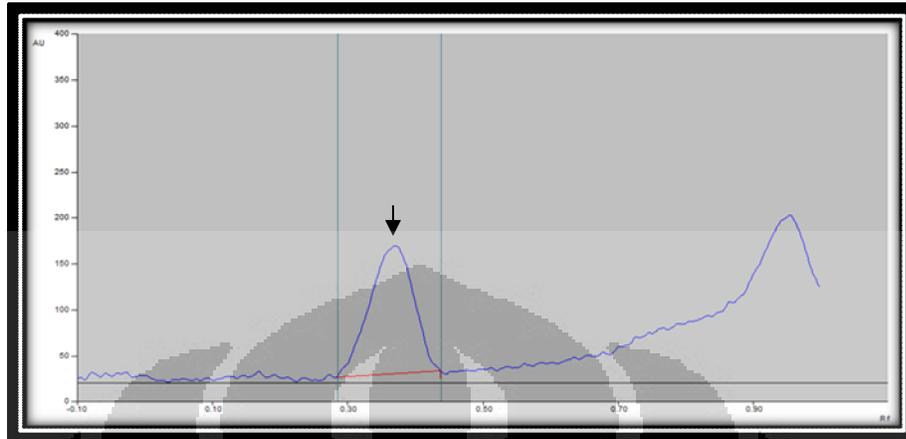


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensulfasetamida 100 ppm (Tanda panah) dengan fase gerak etil asetat-tetrahidrofur (5:5)

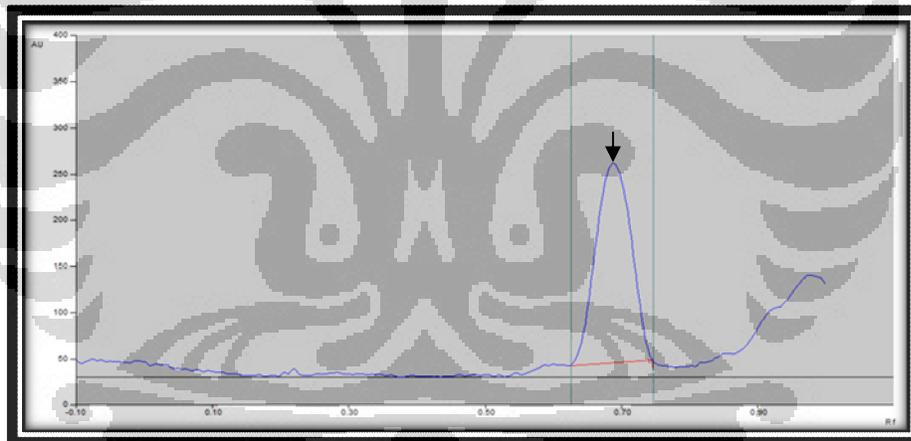


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensulfasetamida 100 ppm (Tanda panah) dengan fase gerak etil asetat 100%

(Lanjutan)

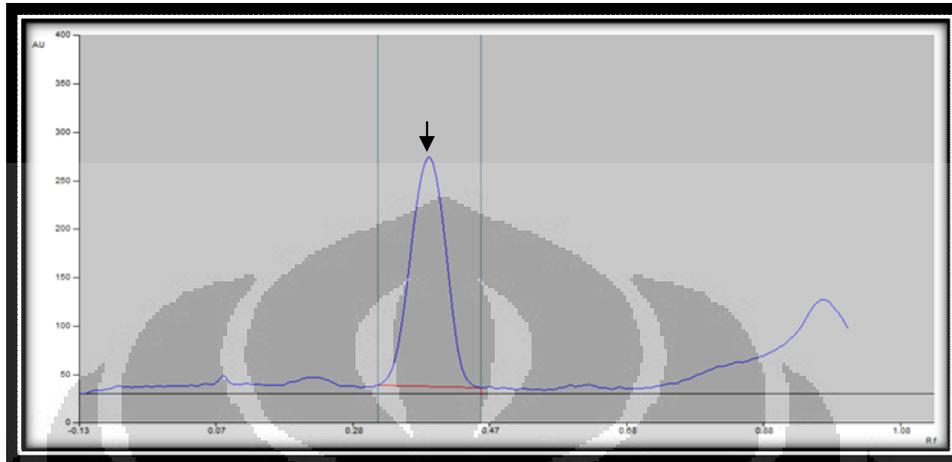


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak tetrahidrofuran-sikloheksan (5:5)

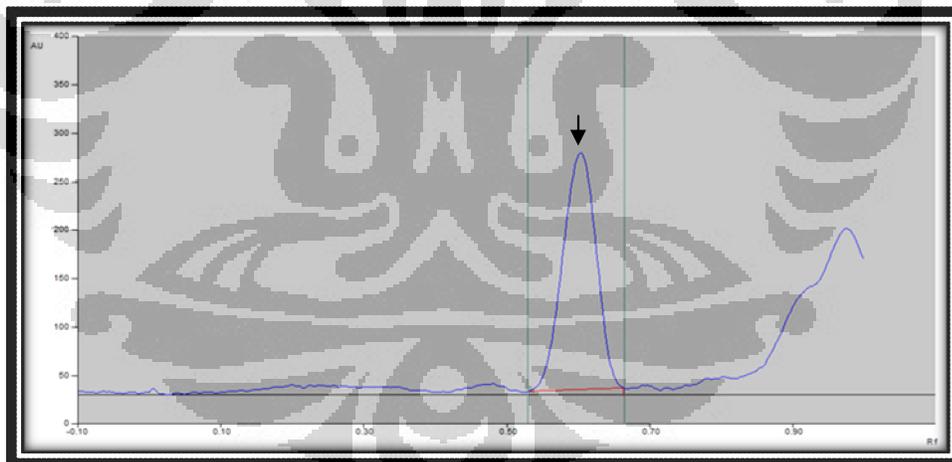


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]benzensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak tetrahidrofuran-sikloheksan-etilasetat (2,5:2,5:5)

(Lanjutan)

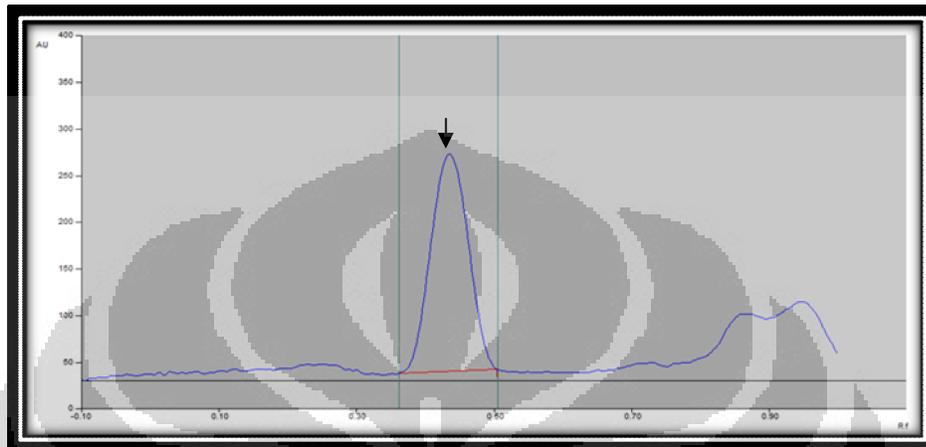


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etilasetat (2:4:4)

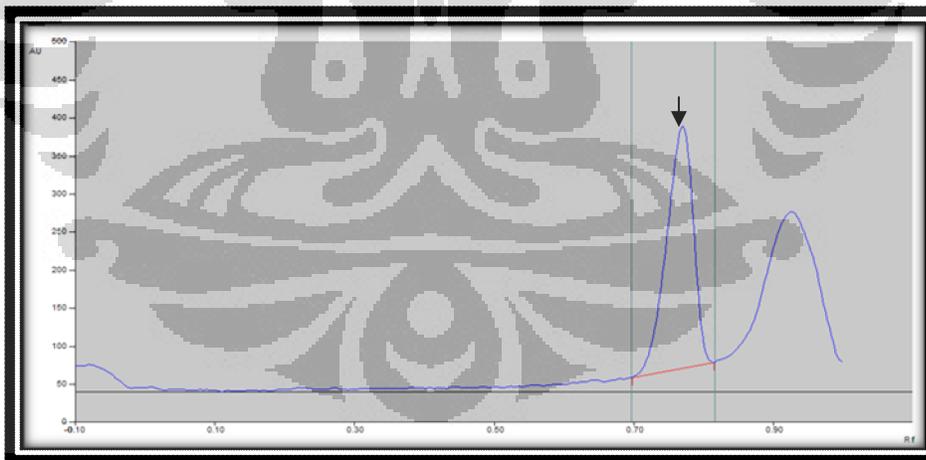


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etil]bensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etilasetat (3:3:4)

(Lanjutan)

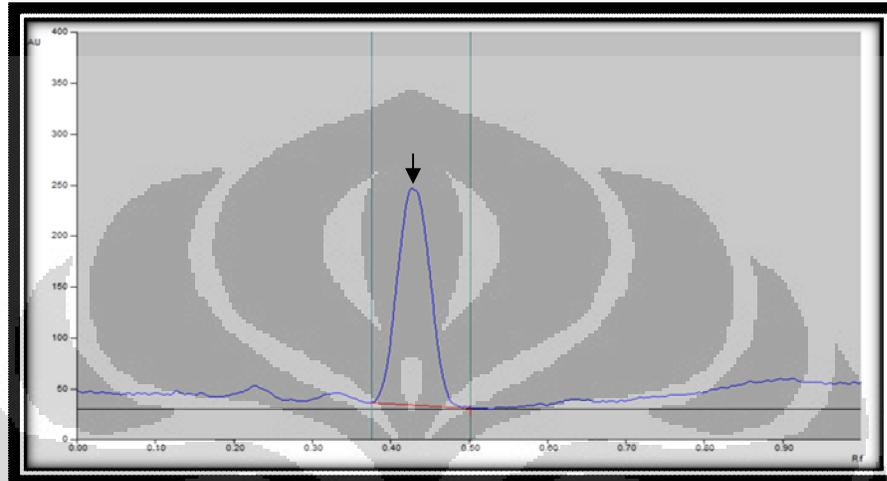


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak sikloheksan-etil asetat (3:7)

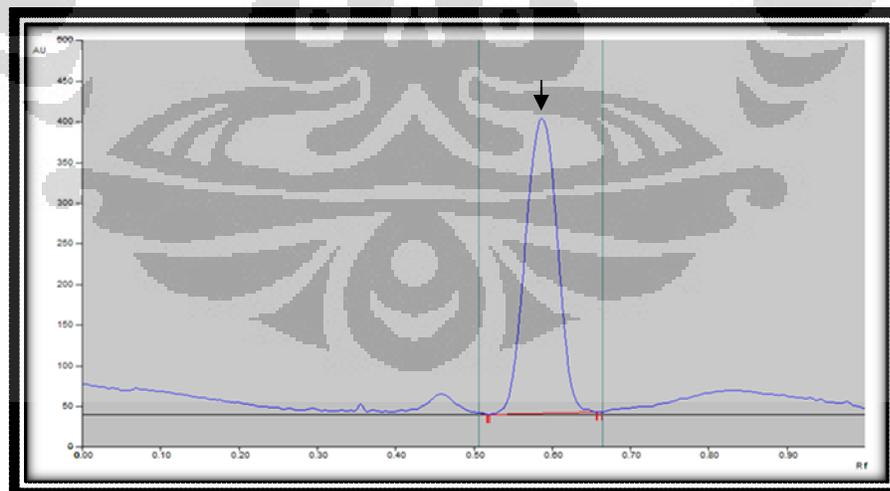


Gambar kurva densitas serapan 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il}etinil]bensulfasetamida (Tanda panah) 100 ppm dengan fase gerak tetrahidrofur-an-sikloheksan-etilasetat (4:2:4)

Lampiran 7. Kurva densitas kontrol senyawa uji dan pembanding



Gambar kurva densitas kontrol 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfasetamida (Tanda panah) dengan fase gerak tetrahidrofuransikloheksan-etil asetat (3:3:4) pada 324 nm; nilai Rf 0,44



Gambar kurva densitas kontrol 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksifenil)-kuinazolin-2-il} etinil]benzensulfonamida (Tanda panah) dengan fase gerak tetrahidrofuransikloheksan-etil asetat (3:3:4) pada 324 nm; nilai Rf 0,61