

Studi Geseran Spektrum UV Senyawa Asam Barbiturat Pada Plat AL-TLC Si G 60 F254 Akibat Pengaruh Perbedaan pH Pengeluan Untuk Keperluan Uji Konfirmasi

I. M. A. G. Wirasuta^{a,b)}, N. G. Indriyaningsih^{b)}, dan N. M. Suaniti^{b,c)}

^{a)}Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

^{b)}Lembaga Forensik Sains dan Kriminologi Universitas Udayana, Email:mgelgel1@yahoo.de

^{c)}Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRACT

The UV-spectra-shifting of allobarbitol, barbitol, butalbital and phenobarbital on AL-TLC-Si gel 60 F₂₅₄ under exposed different pH eluent, drying TLC-plate at 110°C, and then plate placed at room temperature for more than 17 hours has been carried out. Spectra UV were read by using TLC-Scanner 3 –Camag-Muttenz-Switzerland between 190 and 300 nm. Aim of this research was to study UV-spectra-shifting which can conduct error by confirmation test using in situ UV spectra.

There was no significant UV-spectra-shifting of barbiturate on TLC-plate after exposed by mobile phase: 10% HCl in methanol (pH=1), chloroform-acetone (80:20, v/v, pH=5), methanol-n-buthanol (60:40, v/v, pH=6), methanol-ammonia (100:1,5, v/v, pH=10) respectively. The significant shifting of UV spectra were obtained after TLC-plate exposed by cyclohexane-toluene-diethyl amine (75:15:10, v/v, pH=11) and 0,1 M KOH in methanol (pH=12), the spectrum shifting was 66% and 23% compared with spectra at pH=1. Drying of the TLC-plates after exposed by mobile phase conducted no significant UV-spectra shifting, except after exposed by cyclohexane-toluene-diethyl amine (the shifting was 45%). Humidity absorption while placing the TLC-plates at room temperature for more than 17 hours after exposed by strong pH base lead the shifting UV-spectra of barbiturate to the weak base or neutral spectra. These shifting UV-spectra should be taken in consideration on confirmation test of barbiturate based TLC-UV in-situ spectra to reduce error.

Keyword : allobarbitol, barbitol, butalbital, phenobarbital, AL-TLC-Si gel 60 F₂₅₄, UV spectrum

PENDAHULUAN

Tosikologi forensik menekunkan diri pada aplikasi atau pemanfaatan ilmu toksikologi untuk kepentingan peradilan [1]. Salah satu bidang kerja toksikologi forensik adalah analisis obat terlarang di darah dan urin pada kasus penyalahgunaan narkotika dan obat terlarang lainnya. Secara umum analisis toksikologi forensik terdiri dari tiga tahap yaitu: 1) uji penapisan “screening test” 2) uji konfirmasi yang meliputi uji identifikasi dan kuantifikasi, 3) langkah terakhir adalah interpretasi temuan analisis dan penulisan laporan analisis.

Teknik kromatografi datar, seperti TLC/HPTLC yang dikombinasi dengan Spektrofotodensitometri adalah salah satu teknik analisis yang juga digunakan baik dalam uji skrining maupun pada uji konfirmasi [2, 3]. Hasil analisis dengan teknik ini akan memberikan dua data penting, yaitu harga faktor retensi (hRf) dan spektrum UV dari masing-masing puncak kromatogram. Uji konfirmasi pada teknik ini dilakukan dengan membandingkan spektrum UV analit dengan spektrum pustaka pada rentang nilai hRf $\pm$ 7. Kesalahan interpretasi spektrum UV analit dapat terjadi apabila terjadi perubahan bentuk spektrum UV analit akibat perlakuan selama analisis, seperti pengaruh berbagai reagen pada saat ekstraksi analit dari matrik pembawanya, pengaruh pH fase gerak pada saat analit dipisahkan dengan KLT,

perbedaan waktu dan suhu selama pengeringan pelarut pengeluan setelah plat dielusi.

Asam barbiturat dan turunannya telah banyak dilaporkan akan mengalami perubahan bentuk spektrum UV-nya pada pelarut dengan pH yang berbeda-beda. Perubahan bentuk spektrum senyawa turunan asam barbiturat ditentukan oleh reaksi disosiasi asam barbiturat menuju ion mono laktim atau dilaktim [4]. Geseran bentuk spektrum asam barbiturat ini belum ada yang melaporan pada medium AL-TLC.

Dalam penelitian ini dipelajari perubahan bentuk senyawa turunan asam barbiturat, yaitu allobarbitol, barbitol, butalbital, dan fenobarbital pada medium padat AL-TLC setelah diekspos dengan berbagai fase gerak yang memiliki pH berbeda, setelah pengeringan pengelusi pada oven suhu 110°C selama 10 menit, serta penyimpanan plat setelah analisis pada ruang terbuka lebih dari 17 jam. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari perubahan bentuk spektrum UV-analit selama proses analisis menggunakan teknik TLC-densitometri untuk mengurangi kesalahan dalam identifikasi analit.

MATERIAL DAN METODE

Bahan yang digunakan antara lain: standar baku pembanding senyawa turunan asam barbiturat seperti allobarbitol, barbitol, butalbital dan fenobarbital

diperoleh dari Balai Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Jakarta. Bahan-bahan kimia yang digunakan memiliki derajat proanalisis dari Merck-Germany, meliputi: amonia, aseton, toluena, kloroform, metanol, n-butanol, sikloheksana, dietilamin, KOH, asam klorida. Penetapan pH larutan pengelusi menggunakan *pH indicator-strips non-bleeding* (Merck-Germany) dan plat AL-TLC si gel 60 F₂₅₄ (Merck-Germany).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: pipet ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, labu ukur 10 mL dan bejana kromatografi, oven, penjepit, timbangan analitik, kotak plastik (tapperware), Linomat V (Camag-Muttenz-Switzerland), alat pengaduk mekanik, lampu UV 254 nm dan 365 nm dan spektrofotodensitometer (Camag TLC Scanner 3-Camag-Muttenz-Switzerland).

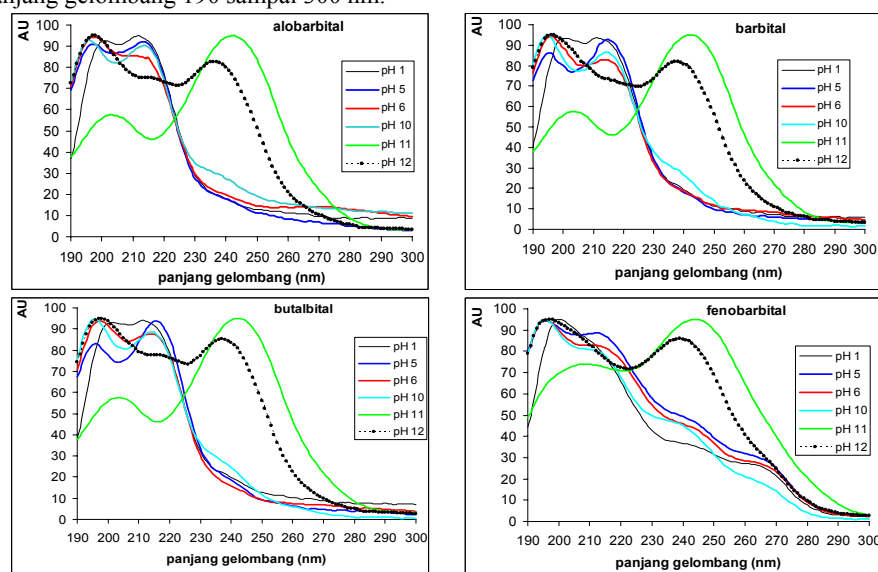
Penelitian ini dimulai dengan melarutkan senyawa alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol dibuat dengan konsentrasi dalam metanol berturut-turut 1,1 µg/µL; 1,98 µg/µL; 1,68 µg/µL dan 1,92 µg/µL dalam metanol. Sebanyak 4,0 µL masing-masing larutan alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol ditotolkan pada lima plat AL-TLC Si gel 60 F₂₅₄ yang berukuran 5x2 cm dengan menggunakan Linomat V. Spektrum UV masing-masing noda analit dibaca dengan menggunakan *TLC Scanner 3* pada daerah panjang gelombang 190 sampai 300 nm.

Larut pengelusi yang digunakan: a) HCl 10% dalam metanol (pH 1), b) kloroform:aseton (80:20, v/v) (pH 5), c) metanol:n-butanol (60:40, v/v) (pH 6); d) metanol:amonia (100:1,5, v/v) (pH 10), e) sikloheksana:toluena: dietilamin(75:15:10, v/v) (pH 11), f) 0,1M KOH dalam metanol (pH 12). Plat TLC yang ditotolkan dengan analit kemudian dicelupkan ke dalam masing-masing larutan selama 10 detik dan diletakkan pada posisi mendatar dibiarkan di udara terbuka selama 5 menit. Selama plat diekspose dengan larutan pengelusi, spektrum UV analit kembali dibaca, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Sptrum UV analit dibaca kembali setelah pengeringan dan terakhir kali spektrum analit ditentukan kembali setelah plat disimpan lebih 17-48 jam.

Digunakan analisis korelasi silang "*cross-correlation function*" pada rentang daerah panjang gelombang analisis (190 s/d 300 nm). Koefisien korelasi, *r* dihitung dengan [5]:

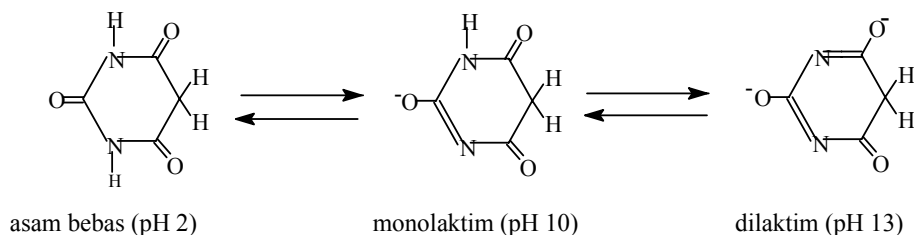
$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

dimana *x_i* dan *y_i* adalah harga absorpsi relatif (AU) dari dua spektrum yang dibandingkan pada panjang gelombang *i*, penjumlahan dilakukan pada rentang gelombang analisis (190 s/d 300 nm).



Gambar 1. Spektrum UV alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol setelah diekspose dengan berbagai pH pengelusen selama 5 menit

Keterangan : pH = 1 diekspose pengelusen (HCl 10% dalam metanol); pH = 5 diekspose pengelusen (kloroform:aseton = 80:20 v/v), pH = 6 diekspose pengelusen (metanol:n-butanol = 60:40 v/v), pH = 10 diekspose pengelusen (metanol:amonia = 100:1,5 v/v), pH = 11 diekspose pengelusen (sikloheksana:toluena:dietilamin = 75:15:10 v/v), pH = 12 diekspose pengelusen (0,1 M KOH dalam metanol)



Gambar 2. Reaksi disosiasi barbiturat pada pH 2, 10 dan 13 [6]

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spektrum UV senyawa alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol setelah diekspose oleh berbagai pelarut pengelusi ditampilkan pada Gambar 1. Perubahan bentuk spektrum senyawa turunan asam barbiturat ditentukan oleh reaksi disosiasi asam barbiturat menuju ion mono laktim atau dilaktim [4]. Pada lingkungan $\text{pH} \leq 2$ senyawa asam barbiturat berada dalam bentuk asamnya, dimana pada kondisi seperti ini ikatan rangkap $\text{C}=\text{O}$ dari asam barbiturat berada dalam keadaan terisolasi (lihat Gambar 2). Hal ini mengakibatkan senyawa alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol setelah diekspose dengan larutan 10 % HCl dalam metanol (pH 1) tidak memberikan puncak serapan pada daerah panjang gelombang 220 sampai 300 nm [4].

Pemunculan bahu pada panjang gelombang 240 nm dari spektrum UV alobarbitol, barbitol dan butalbitol setelah plat diekspose dengan larutan pengelusi pH 10, menunjukkan senyawa barbiturat telah mengalami disosiasi dari bentuk asamnya menuju ion monolaktim (lihat Gambar 2). Perubahan ionisasi ini membentuk ion monolaktim mengakibatkan perpanjangan ikatan rangkap terkonjugasi dari ikatan karbonil ($\text{C}=\text{O}$) terisolasi menjadi $^-\text{O}-\text{C}=\text{N}-\text{C}=\text{O}$. Perpanjangan ikatan rangkap terkonjugasi ini menyebabkan geseran batokromik, munculnya bahu pada panjang gelombang 240 nm.

Senyawa alobarbitol, barbitol, butalbitol dan fenobarbitol pada plat setelah diekspose dengan baik dengan larutan 0,1 M KOH dalam metanol (pH 12) maupun dengan pengelusi sikloheksana:toluena:diethylamin(75:15:10, v/v, pH 11) mengakibatkan munculnya puncak pada daerah panjang gelombang 240 - 255 nm. Disosiasi dari ion monolaktim menuju ion dilaktim $\{^-\text{O}-\text{C}=\text{N}-\text{C}(\text{O})=\text{N}-\text{C}=\text{O}\}$ pada pH basa kuat mengakibatkan perpanjangan ikatan rangkap terkonjugasi [6]. Hal ini bertanggung jawab pada geseran batokromik puncak spektrum UV senyawa turunan asam barbiturat.

Analisis perubahan bentuk spektrum UV senyawa turunan barbiturat setelah diekspose dengan berbagai pH pengelusi dibandingkan dengan spektrum UV setelah plat diekspose dengan larutan 10% HCl dalam metanol (pH 1) ditampilkan dalam Tabel 1. Perbandingan bentuk masing-masing spektrum UV analit setelah diekspose pada pH 5, 6 dan 10 dengan

spektrum UV setelah diekspose pada pH 1 tidak menunjukkan perubahan bentuk spektrum yang signifikan ($r \geq 0,97$). Pendedahan senyawa turunan asam barbiturat dengan pelarut pengelusi dengan pH 11 memberikan perubahan bentuk spektrum sebesar 66 %, jika dibandingkan dengan spektrum UV pada pH 1, dan 23% pada dedahan dengan pH 12. Dalam analisis toksikologi forensik indentifikasi analit berdasarkan bentuk spektrum UV, persyaratan kesesuaian bentuk spektrum UV dengan data pustaka yaitu: $r \geq 0,95$ (Ojanpera and Vuori, 1994). Hal ini menunjukkan perbedaan pH pengelusi sampai $\text{pH} \leq 10$ tidak menimbulkan kesalahan yang berarti, jika spektrum pustaka dalam keadaan pH 1.

Tabel 1. Nilai koefisien korelasi spektrum UV senyawa turunan asam barbiturat pada plat TLC pada berbagai pH pengelusi dibandingkan dengan spektrum UV 10% HCl dalam metanol (pH 1)

Senyawa	koefisien korelasi (r) antar spektrum				
	r_{1_5}	r_{1_6}	$r_{1_{10}}$	$r_{1_{11}}$	$r_{1_{12}}$
Alobarbitol	0,98	0,97	0,97	0,23	0,74
Barbitol	0,98	0,97	0,96	0,26	0,75
Butalbitol	0,97	0,98	0,97	0,25	0,75
Fenobarbitol	0,97	0,97	0,96	0,62	0,85
Rata-rata	0,98	0,97	0,97	0,34	0,77

Keterangan: $r_{a,b}$: koefisien korelasi perbandingan spektrum UV analit setelah diekspose pengelusi pada $\text{pH}=a$ dengan spektrum setelah diekspose pengelusi $\text{pH}=b$; a = pH 1, sedangkan b berturut-turut pH 6, 10, 11, dan 12.

Pengeringan plat setelah diekspose pelarut pengelusi {1, 2, 3, 4, dan 6} dalam oven pada suhu 110°C selama 10 menit tidak memberi perubahan bentuk spektrum UV alobarbitol, barbitol, butalbitol, dan fenobarbitol ($r \geq 0,98$), tetapi perubahan bentuk spektrum UV senyawa asam barbiturat sebesar 45% terjadi pada pengeringan setelah analit pada plat diekspose dengan pengelusi: sikloheksana:toluena:diethylamin(75:15:10, v/v), pH11 (lihat Tabel 2). Penyimpanan plat setelah diekspose pengelusi basa kuat (pH 11 dan 12) kemudian disimpan selama 17 s/d 48 jam memberikan perubahan bentuk spektrum yang sangat signifikan. Perubahan bentuk spektrum UV basa kuat ini menuju spektrum UV pada keadaan disosiasi ion monolaktim. Perubahan ini terjadi diduga oleh

penyerapan lembab udara (uap H₂O) dalam ruangan, yang akan menginduksi ikatan hidrogen silika dalam plat, dan berakibat pada penurunan pH medium silika menuju basa lemah sampai netral.

Perubahan bentuk spektrum turunan asam barbiturat akibat perbedaan pH larutan pengekspres, dapat dijadikan sebagai informasi tambahan dalam uji konfirmasi (uji pemastian) identitas senyawa asam barbiturat berdasarkan TLC-spektrofotodensitometri.

Tabel 2. Harga koefisien korelasi perubahan bentuk spektrum UV senyawa turunan asam barbiturat akibat pengeringan dan penyimpanan plat TLC setelah diekspos pelarut pengelusi

Senyawa \ Pengelusi	a		b		c		d		e		f	
	r_{e_k}	r_{e_s}	r_{e_k}	r_{e_s}	r_{e_k}	r_{e_s}	r_{e_k}	r_{e_s}	r_{e_k}	r_{e_s}	r_{e_k}	r_{e_s}
Alobarbitol	0,97	0,98	0,98	0,99	1,00	0,99	1,00	0,97	0,56	0,41	0,97	0,80
Barbital	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,98	0,42	0,29	0,99	0,87
Butalbitol	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,98	0,42	0,30	0,98	0,86
Fenobarbitol	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,80	0,73	1,00	0,97
Rata-rata	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,98	0,55	0,43	0,99	0,88

Keterangan: pelarut pengelusi: a) pH=1; b) pH=5; c) pH=6; d) pH=10; e) pH=11; dan f) pH = 12; r_{e_k} : koefisien korelasi perbandingan spektrum UV analit setelah diekspos dengan spektrum setelah dikeringkan dalam oven 110°C selama 10 menit; r_{e_s} : koefisien korelasi perbandingan spektrum UV analit setelah diekspos dengan spektrum setelah dikeringkan dalam oven 110°C selama 10 menit kemudian disimpan selama 17 – 48 jam

KESIMPULAN

Pendedahan alobarbitol, barbital, butalbitol dan fenobarbitol pada plat oleh pengelusi pH 1, 5, 6 dan 10 tidak memberikan nilai perubahan bentuk spektrum yang signifikan ($r \geq 0,95$), namun pengelusi dengan basa kuat memberikan geseran puncak spektrum UV ke arah batokromik dan mengakibatkan perubahan sebesar 23 % pada pH 12 dan sebesar 64 % pada pH 11, jika dibandingkan dengan spektrum UV pada pH 1.

Pengeringan plat setelah diekspos pelarut pengelusi {10% HCl dalam metanol, kloroform:aseton (80:20, v/v), metanol:n-butanol (60:40, v/v), metanol:amonia (100:1,5, v/v), dan 0,1M KOH dalam metanol} tidak memberikan perubahan bentuk spektrum yang signifikan ($r \geq 0,98$), namun perubahan sebesar 45% terjadi pada pengeringan plat setelah diekspos dengan sikloheksana:toluena:dietilamin(75:15:10, v/v), pH 11. Penyerapan lembab udara oleh plat selama penyimpanan dapat merubah spektrum UV asam barbiturat dalam suasana basa kuat menuju keadaan basa lemah sampai netral. Perubahan spektrum ini dapat dijadikan sebagai data tambahan dalam uji konfirmasi TLC- Densitometri senyawa turunan barbiturat.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Wirasuta I MAG, 2008, Analisis toksikologi forensik dan interpretasi temuan analisis, Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences; 1(1):47-55.

[2] Ojanpera I, and Vuori, E, 1994, Identification of Drugs in Autopsy Liver Samples by Instrumental Qualitative Thin Layer Chromatography, J. Chromatogr A; 674: 147-152.

[3] Ahrens B, Blankenhorn D, and Spangenberg B, 2002, Advanced fibre optical scanning in thin-layer chromatography for drug identification, J. Chromatogr. B.; 772: 11–18.

[4] Schmidt G, 1962, Detection and Estimation of Barbituric Acid Derivates, in Lundquist F, (Ed), Methods of Forensic Science, Volume I, University Institut of Forensic Medicine (Universitas of Copenhagen) Copenhagen Denmark, Interscience Publishers, a division of John Wiley and Sons, New York/London.; pages 466-470.

[5] Yoon WL, Jee RD, Moffat AC, Blackler PD, Yeung K, and Leeb DC, 1999, Construction and transferability of a spectral library for the identification of common solvents by near-infrared transfectance spectroscopy, Analyst, 124: 1197–1203.

[6] Chao MKC, Albert KS, and Fusari SA, 1977, Phenobarbiturat, in Florey K (Ed)., Analytical Profile of Drugs Substance, Academic Press New York, pages 359-393