

**APLIKASI *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* PADA OPTIMASI
PARAMETER REAKSI ENALAPRIL DENGAN 1-FLUORO-2,4-
DINITROBENZENA**

Risky Budi Kurniawan

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

Risky_budi@yahoo.com

Abstrak : Enalapril merupakan obat golongan ACE-Inhibitor yang kekurangan gugus kromofor, sehingga memberikan serapan yang rendah pada daerah UV-Vis.

Oleh sebab itu perlu dilakukan metode derivatisasi untuk meningkatkan sensitivitas serapan dengan penambahan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB) yang dapat menambah gugus kromofor, sehingga dapat meningkatkan serapan. Pada reaksi enalapril dengan FDNB dipengaruhi oleh parameter pH, suhu, waktu reaksi, waktu pemanasan. Penelitian kali ini membandingkan hasil penelitian optimasi oleh Bernadus (2015) tanpa menggunakan *Response Surface Methodology* dengan hasil optimasi pH 11, suhu 65°C, waktu reaksi 20 menit, dan waktu pemanasan 10 menit, sedangkan kondisi optimum penelitian dengan *Response Surface Methodology* diperoleh hasil optimasi pH daparborat 11,45, waktu reaksi 22,22 menit selama, suhu pemanasan 68,54°C, serta waktu pemanasan selama 10,96 menit.

Kata Kunci : Enalapril, FDNB, derivatisasi, optimasi, Response Surface Methodology

Abstract : Enalapril is an drugs ACE- inhibitors class, that deficiency cluster chromophore, enalapril giving uptake is low light absorbation in the area UV – Vis. Therefore derivatization reaction methods needs to be increase the sensitivity uptake by enalapril. reaction 1 - fluoro - 2,4 dinitrobenzen(FDNB) that can be adds Cluster chromophore , so that can improve uptake. FDNB and enalapril reaction is influenced by the parameters of pH , temperature , reaction time , heating time. Research compares the results of research Optimization by Bernardus (2015) without using methods Response Surface Methodology and the result of optimation is, pH 11, Temperature 65°C, reaction time 20 minutes, and heating time is 10 minutes. And while the optimum conditions of research with Response Surface Methodology, and the result of optimation is pH Borate buffer 11.45, reaction time is 22.22 minutes, 68.54°C warming of temperature (oven), and the time of heating is 10.96 minutes.

Keyword : Enalapril, FDNB, derivatization, Optimisation, Response Surface Methodology

PENDAHULUAN

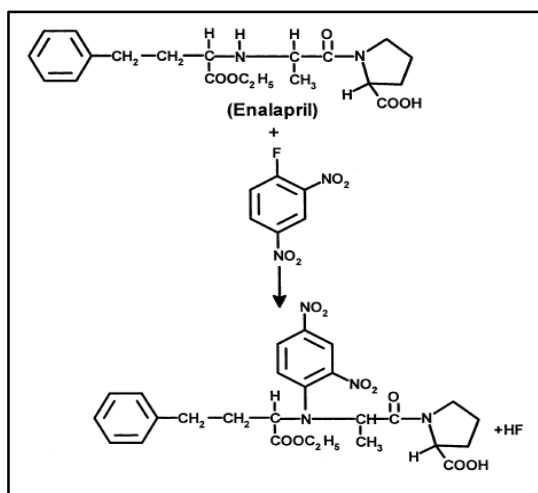
Tekanan darah merupakan faktor yang sangat penting pada system sirkulasi, dimana dalam beberapa tahun terakhir terjadi peningkatan penderita gangguan tekanan darah, terutama tekanan darah tinggi atau yang lebih sering dikenal dengan hipertensi. Hipertensi biasa disebut sebagai “silent killer” (WHO 2013), karena apabila penyakit ini tidak terkontrol akan menyerang target organ dan dapat menyebabkan serangan jantung, stroke, gangguan ginjal, serta kebutaan.

Menurut data WHO penyakit kardiovaskular secara global sekitar 17 juta kematian pertahun, dan hampir sepertiga dari total penderita tersebut karena gangguan kardiovaskular. Dari jumlah tersebut komplikasi hipertensi mencapai 9,4 juta kematian di seluruh dunia setiap tahunnya (WHO, 2013). Hipertensi telah diidentifikasi sebagai salah satu faktor yang berhubungan secara linear dengan mortalitas dan morbiditas penyebab terjadinya penyakit kardiovaskular (CVD).

Enalapril atau *N-[N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-L-proline* merupakan penghambat *angiotensin-converting-enzyme* (ACE Inhibitor), dengan mekanisme kerja menghambat terbentuknya Angiotensin II. Bila angiotensin II terbentuk maka akan menyebabkan vasokonstriksi (penyempitan pembuluh darah) dan sekresi aldosteron meningkat, yang apabila terjadi peningkatan maka akan menyebabkan retensi Na^+ dan volume H_2O meningkat. Sifat Na^+ atau garam yang selalu dikelilingi oleh air akan menyebabkan volume darah meningkat. Dengan penggunaan golongan ACE Inhibitor maka hasil pada angiotensin II tidak akan terbentuk sehingga tekanan darah akan menurun (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Pada senyawa-senyawa inhibitor ACE termasuk enalapril memberikan serapan yang rendah pada daerah UV-Vis, sehingga sulit untuk dianalisis. Golongan ini merupakan golongan obat yang mempunyai gugus kromofor minim. Enalapril dapat dianalisis secara spektrofotometri, tetapi memerlukan suatu teknik analisis

yang dapat meningkatkan absorbansi, yaitu dengan reaksiderivatisasi menggunakan pereaksi 1-fluoro-2,4-dinitrobenzena (FDNB). Penderivat FDNB disebut juga pereaksi sanger, merupakan penderivat untuk senyawa yang memiliki gugusamina primer atauaminasekunder (Coppex, 2000).



Gambar 1 Reaksiderivatisasi antara enalapril dengan 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzena

Reaksiderivatisasi enalapril dan FDNB sangat dipengaruhi oleh beberapa kondisi yaitu pH, Suhu, Waktu pemanasan dan Waktu reaksi. Oleh karena itu untuk mengetahui besar pengaruh terhadap kondisi tersebut, maka dilakukan optimasi terhadap kondisi-kondisi tersebut, namun untuk memahaminya seberapa jauh suatu proses optimasi dipengaruhi oleh beberapa variabel yang dinamis, maka diperlukan data suatu percobaan dalam jumlah yang besar dan membutuhkan waktu yang lama, secara otomatis juga memerlukan biaya dalam jumlah yang cukup besar. Biaya yang besar dan waktu yang lebih lama untuk optimasi dapat diperkecil dengan cara dilakukannya perhitungan secara statistika terlebih dahulu.

Salah satu metode statistika untuk optimasi dari suatu respon dan yang mempertimbangkan interaksi antar variabel tersebut adalah *Response Surface Methodology* atau sering disingkat dengan RSM. Alasan perhitungan menggunakan RSM adalah untuk mengetahui seberapa besar adanya interaksi dari parameter, akan

di dapatkan nilai parameter yang lebih akurat karena berdasarkan perhitungan secara statistik, dan meminimalkan biaya yang dikeluarkan.

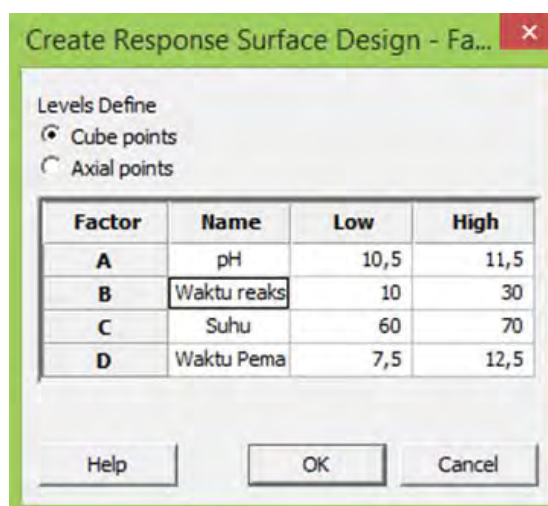
METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam penelitian : Spektrofotometer, Kuvet, Mikropipetukuran 20-200 μ l (Socorex Acura 821), Mikropipetukuran 100-1000 μ l (Socorex Acura 821), Mikropipetukuran 0,5-5,0 ml (*Brand Transferpette*), pH meter (SCHOOT), Timbangan analitik (AND GR-202), Ultrasonic Bath (BRANSON 1200 E 2), Alat-alat gelas (beaker gelas, gelasukur, corong gelas, pipettetes, pengaduk kaca, labuukur), Perangkat komputer. Perangkat komputer berfungsi untuk memasang (install) program yang digunakan, Program analisis statistik. Program analisis statistik yang digunakan adalah Minitab versi 16.

Bahan-bahan yang digunakan : Enalapril (Fluka), FDNB (1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzena) (Fluka), NaOH p.a, KCL p.a, HCl 1 N, Asam borat p.a, Asetonitril pro HPLC (E. Merck), Methanol pro HPLC (E. Merck), Aqua demineralisata pro analisis (universitas Surabaya Fakultas Farmasi).

METODE KERJA

Tahap 1 Pengolahan data pada Response Surface Methodology



Tabel 1 bentuk create design pada analisis

Tahap 2 Pengolahan data pada Response Surface Methodology

StdOrder	RunOrde	PtType	Blocks	pH	Waktu reaksi	Suhu	Waktu Pemanasan	hasil absorbansi
14	1	1	1	11,5	10	70	12,5	
11	2	1	1	10,5	30	60	12,5	
8	3	1	1	11,5	30	70	7,5	
27	4	0	1	11	20	65	10	
1	5	1	1	10,5	10	60	7,5	
12	6	1	1	11,5	30	60	12,5	
9	7	1	1	10,5	10	60	12,5	
4	8	1	1	11,5	30	60	7,5	
16	9	1	1	11,5	30	70	12,5	
29	10	0	1	11	20	65	10	
23	11	-1	1	11	20	65	5	
21	12	-1	1	11	20	55	10	
10	13	1	1	11,5	10	60	12,5	
31	14	0	1	11	20	65	10	
22	15	-1	1	11	20	75	10	
3	16	1	1	10,5	30	60	7,5	
2	17	1	1	11,5	10	60	7,5	
7	18	1	1	10,5	30	70	7,5	
28	19	0	1	11	20	65	10	
30	20	0	1	11	20	65	10	
26	21	0	1	11	20	65	10	
6	22	1	1	11,5	10	70	7,5	
5	23	1	1	10,5	10	70	7,5	
15	24	1	1	10,5	30	70	12,5	
24	25	-1	1	11	20	65	15	
13	26	1	1	10,5	10	70	12,5	
19	27	-1	1	11	0	65	10	
18	28	-1	1	12	20	65	10	
17	29	-1	1	10	20	65	10	
20	30	-1	1	11	40	65	10	
25	31	0	1	11	20	65	10	

Tabel 2 nilai parameter yang akan di analisis menggunakan spektrofotometri

Tahap 3 persiapan baku

- **Pembuatan larutan baku induk Enalapril**

Ditimbang 50,0 mg baku induk Enalapril maleat, dilarutkan dalam metanol sampai volume 50,0 mL dan didapat baku induk enalapril dengan konsentrasi 1000 bpj.

- **Pembuatan Larutan Borat dan KCl 0,125 M**

Ditimbang 0,7729 g asam borat dan 0,9319 g kalium klorida, kemudian dilarutkan dengan air bebas dan diencerkan sampai 100,0 ml.

- **Pembuatan Dapar Borat**

Dicampurkan 85,0 ml larutan asam borat dan kalium klorida (0,125 M) dengan sejumlah Natrium Hidroksida 1N, kemudian diukur pH-nya dengan pH-meter hingga pH-nya mencapai pH 8,0 kemudian volume ditambahkan dengan aquadest hingga

100,0 ml. Kemudian bila diinginkan, di adjust terlebih dahulu sampai pH yang diinginkan, ditambahkan larutan NaOH agar menjadi lebih menjadi pH Basa dan ditambahkan larutan HCl agar pH menjadi lebih asam.

- **Pembuatan pereaksi FDNB**

Ditimbang 15,1 mg 1-fluoro-,2,4-dinitrobenzen, dilarutkan asetonitril hingga volume 25,0 ml dan diperoleh konsentrasi 0,0032 M.

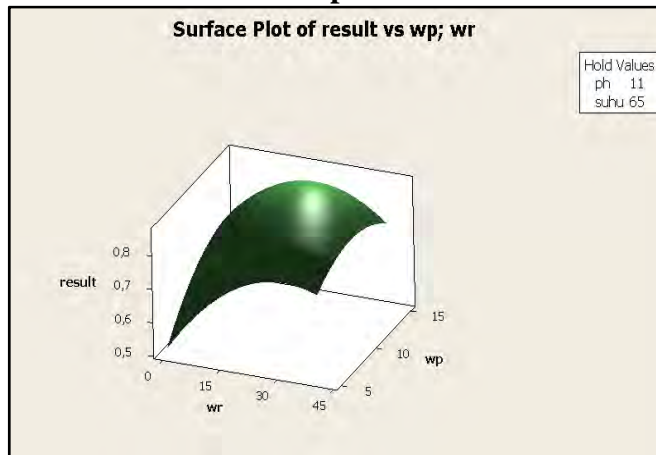
Tahap 4 Optimasi pH daparborat, Waktu reaksi, Waktu pemanasan, dan Suhu terhadap pembentukan Senyawa Derivat

Larutan baku enalapril 1000 bpj dipipet 50,0 μ l ke dalam 3 tabung reaksi tertutup, kemudian pada masing-masing tabung ditambahkan 500,0 μ L daparborat 0,125 M dan 125 μ l 1-fluoro-2,4-dinitrobenzena (0,0032M), lalu ditambahkan 2,0 ml asetonitril. Buffer borat ditambahkan dengan variasi pH pada masing-masing tabung reaksi yang telah ditentukan. Larutan dihomogenkan menggunakan ultrasonik dengan Waktu reaksi yang telah ditentukan. Kemudian larutan dipanaskan dengan oven pada Suhu yang telah ditentukan. Dan waktu pemanasan yang telah ditentukan. Setelah itu larutan homogen tersebut dipindahkan ke dalam labu ukur 5,0 ml, kemudian ditambahkan HCl 1 N sebanyak 100 μ l dan ditambahkan asetonitril sampai 5,0 ml. Larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang yang sudah ditentukan. Diperoleh kurva antara absorbansi Enalapril-DNB dengan panjang gelombang pada variasi pH, Waktu reaksi, Waktu pemanasan, dan Suhu.

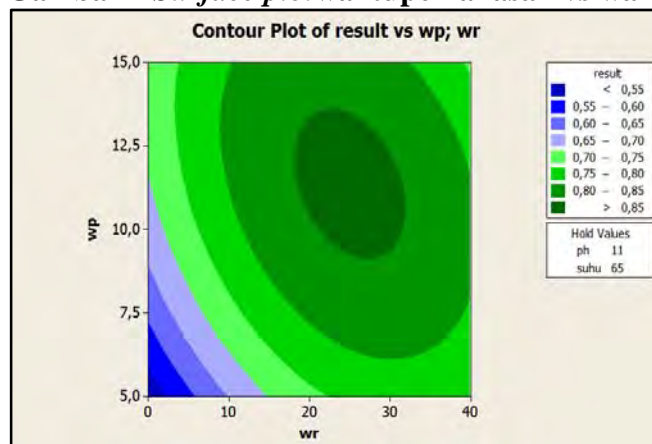
Tahap 5 Hasil analisis dengan RSM

Setelah semua hasil absorbansi dimasukkan dalam program MiniTab maka dilakukan analisis lebih lanjut guna mengetahui kondisi optimum yang valid pada percobaan. Berikut adalah hasil *contour plot* (iris *surface plot*) dan *surface plot* yang dihasilkan berdasarkan percobaan yang dilakukan:

1. Waktu reaksi vs waktu pemanasan

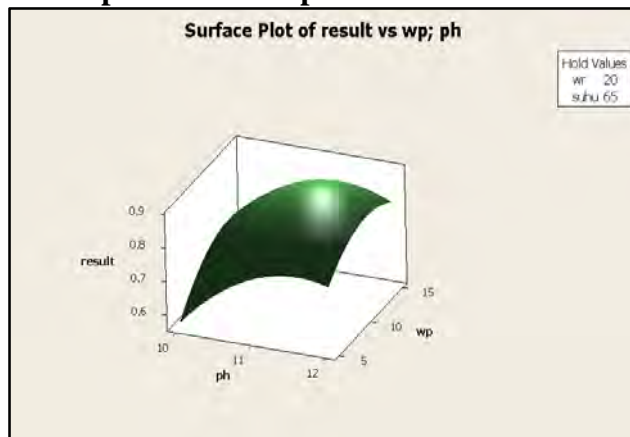


Gambar 2 *Surface plot* waktu pemanasan vs waktu reaksi

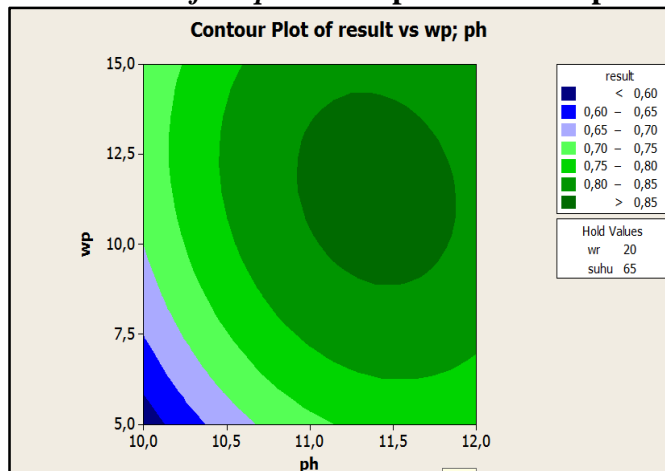


Gambar 3 *Contour plot* waktu pemanasan vs waktu reaksi

2. Waktu pemanasan vs pH

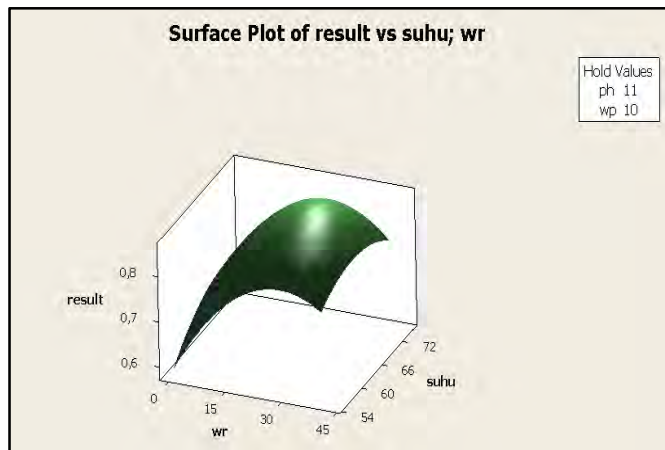


Gambar4 Surface plotwaktupemanasan vs pH

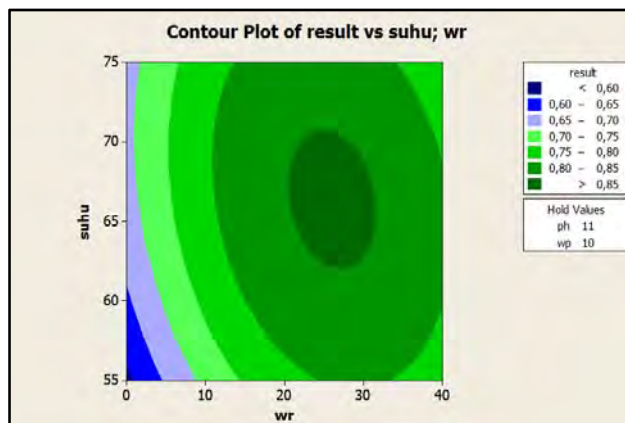


Gambar5 Contour plotwaktupemanasan vs pH

3. Suhu dan waktu reaksi

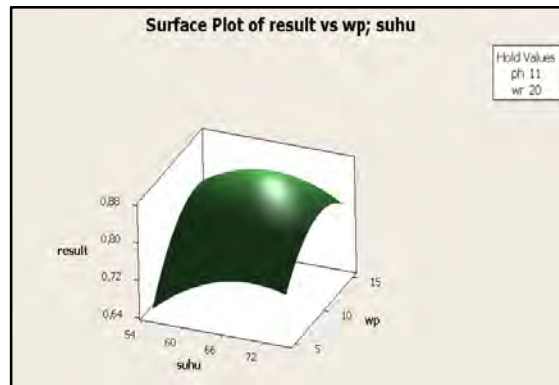


Gambar6 Surface plotsuhu vs waktureaksi

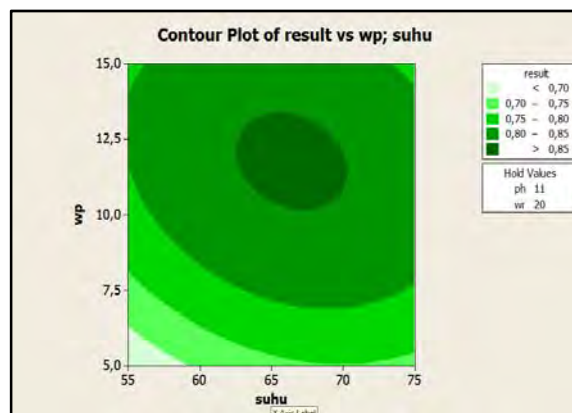


Gambar7 Contour plotsuhu vs waktureaksi

4. Waktupemanasan vs Suhu

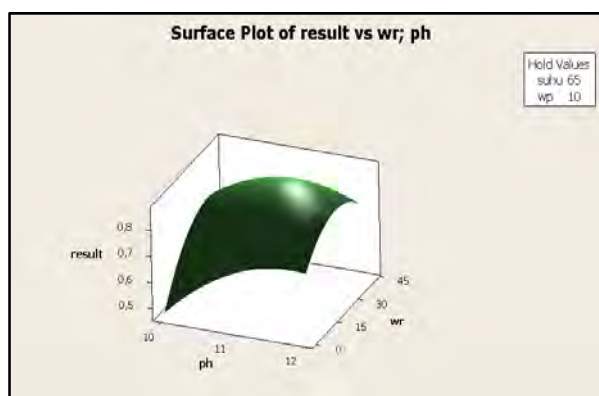


Gambar8 Surface plotwaktupemanasan vs suhu

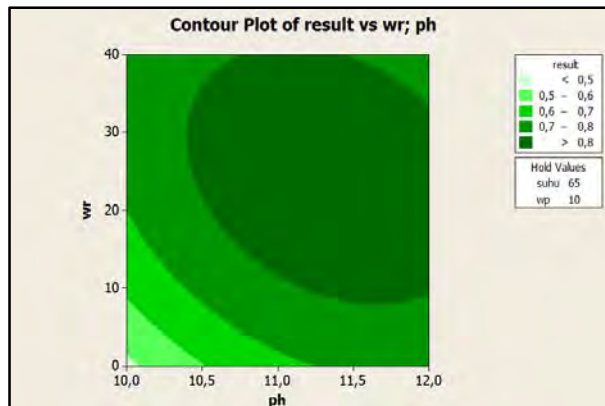


Gambar 9 Contour plotwaktupemanasan vs suhu

5. Waktureaksi vs pH

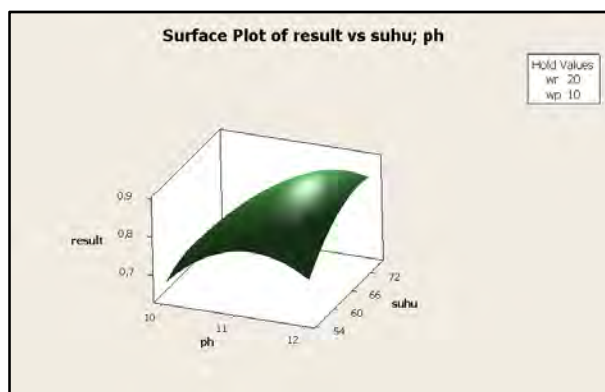


Gambar10 *Surface plot*waktureaksi vs pH

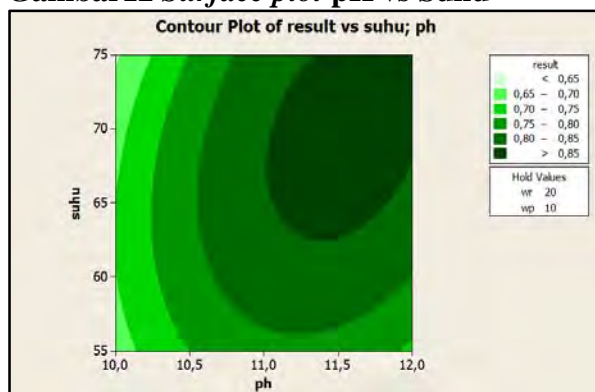


Gambar11 *Contour plot*waktureaksi vs pH

6. pH vs Suhu

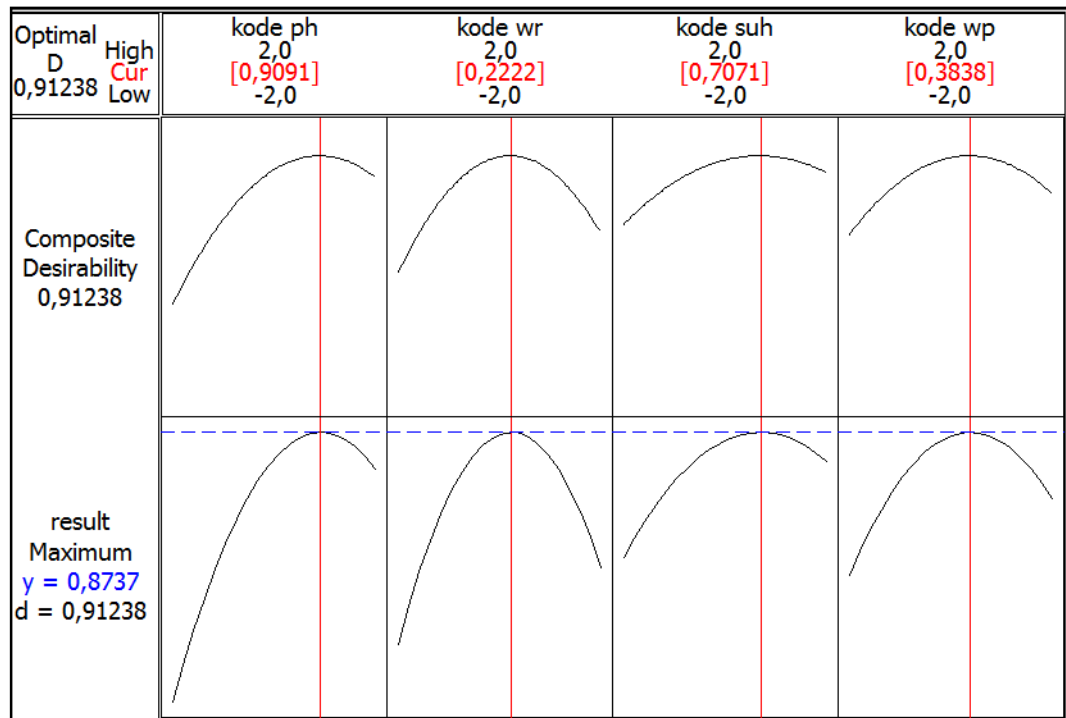


Gambar12 *Surface plot* pH vs Suhu



Gambar13 *Contour plot* pH vs Suhu

Setelah didapat gambar surface dan contour plot seperti di atas langkah selanjutnya adalah mencari nilai optimum pada masing-masing parameter yang dilakukan, yaitu dengan cara mengubah pada bentuk 2D nyaseperti yang dihasilkan pada gambar berikut :



Gambar14 bentuk 2D pada aplikasi RSM

Dari hasil kurva 2D di atas, dapat diketahui nilai sebenarnya dengan melakukan perhitungan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$X = \frac{\xi_i - a}{b}$$

X_i = Melambangkannya variabel ke- i dalam bentuk kode (coded variabel)

ξ_i Melambangkannya variabel ke- i yang sebenarnya (setting variabel)

a = (nilai setting maksimum - nilai setting minimum) : 2

b = selisih antara nilai setting

- **pH optimum**

$$a = 11; b = 0,5; X = 0,9091$$

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 11}{0,5}$$

$$0,9091 = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 11}{0,5}$$

$$= 0,4545 + 11$$

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = 11,4545$$

pH optimum yang didapatkan adalah 10,45

- **Suhu optimum**

$$a = 65; b = 5; X = 0,7071$$

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 65}{5}$$

$$0,7071 = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 65}{5}$$

$$= 3,5355 + 65$$

$$= 68,5355$$

Suhu optimum yang didapatkan adalah 68,54°C.

- **Waktu reaksi optimum**

$$a = 20; b = 10; X = 0,2222$$

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 20}{10}$$

$$0,2222 = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 20}{10}$$

$$= 2,222 + 20$$

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = 22,22 \text{ menit}$$

Waktu reaksi optimum yang didapatkan adalah 22,22 menit.

- **Waktu pemanasan optimum**

$$a = 10; b = 2,5 ; X = 0,3838$$

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 10}{2,5}$$

$$0,3838 = \frac{\sum_{i=1}^n \xi_i - 10}{2,5}$$

$$= 0,9595 + 10$$

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = 10,9595 \text{ menit}$$

Waktupemanasan optimum yang didapatkan adalah 10,96 menit.

Hasi regresi antar parameter menggunakan minitab versi 16

Untuk mengetahui dari beberapa parameter diatas yang paling berpengaruh terhadap dilakukan terjadinya rekasi derivatisasi enalapril-DNB, maka dilakukan regresi yang terdapat pada aplikasi Minitab 16. Hasil dikatakan sangat berpengaruh apabila nilai p yang dihasilkan < 0,05 (suatu angka yang menunjukkan nilai signifikan atau tidak signifikan dalam metode statistik).

Estimated Regression Coefficients for result						
Term	Coef	SE Coef	T	P		
Constant	0.846429	0.010173	83.200	0.000		
ph	0.034208	0.005494	6.226	0.000		
waktu reaksi	0.033375	0.005494	6.075	0.000		
suhu	0.009792	0.005494	1.782	0.094		
waktu pemanasan	0.023458	0.005494	4.270	0.001		
ph*ph	-0.019284	0.005033	-3.831	0.001		
waktu reaksi*waktu reaksi	-0.026159	0.005033	-5.197	0.000		
suhu*suhu	-0.010534	0.005033	-2.093	0.053		
waktu pemanasan*waktu pemanasan	-0.015409	0.005033	-3.061	0.007		
ph*waktu reaksi	-0.013187	0.006729	-1.960	0.068		
ph*suhu	0.009062	0.006729	1.347	0.197		
ph*waktu pemanasan	-0.005563	0.006729	-0.827	0.421		
waktu reaksi*suhu	-0.006562	0.006729	-0.975	0.344		
waktu reaksi*waktu pemanasan	-0.012938	0.006729	-1.923	0.073		
suhu*waktu pemanasan	-0.005437	0.006729	-0.808	0.431		
S = 0.0269163 PRESS = 0.0608051						
R-Sq = 90.51% R-Sq(pred) = 50.22% R-Sq(adj) = 82.21%						
Analysis of Variance for result						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	0.110554	0.110554	0.007897	10.90	0.000
Linear	4	0.070326	0.070326	0.017582	24.27	0.000
Square	4	0.031796	0.031796	0.007949	10.97	0.000
Interaction	6	0.008432	0.008432	0.001405	1.94	0.136
Residual Error	16	0.011592	0.011592	0.000724		
Lack-of-Fit	10	0.010236	0.010236	0.001024	4.53	0.039
Pure Error	6	0.001356	0.001356	0.000226		
Total	30	0.122146				

Tabel 3 Hasi regresi antar parameter menggunakan minitab versi 16

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka diketahui bahwa parameter yang berpengaruh pada derivatisasi antara enalapril dan FDNB adalah pH, waktu reaksi dan waktu pemanasan karena menunjukkan nilai P < 0,05, sedangkan untuk parameter

suhu kurang terlalu berpengaruh secara signifikan terhadap dilakukannya reaksi derivatisasi enalapril-DNB.

KESIMPULAN

- Kondisi optimum pada pembentukan senyawa derivat Enalapril-DNB pada penambahan pH buffer borat 11,45 dengan waktu reaksi menggunakan ultrasonik selama 22,22 menit, kemudian suhu pemanasan pada oven 68,54°C, dan waktu pemanasan pada oven selama 10,96 menit.

SARAN

- Dilakukan optimasi reaksi Enalapril maleat dengan FDNB dengan nilai rentang antar parameter yaitu pH, waktu reaksi, dan suhu pemanasan, dan waktu pemanasan menggunakan *Response surface Methodology* yang lebih luas, sehingga hasil optimasi lebih terlihat jelas.
- Dilakukan optimasi reaksi Enalapril-Maleat dengan FDNB menggunakan *Response Surface Methodology* dengan parameter *mol rati* dan waktu kestabilan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel Razak O, Belal SF, Bedair MM, Barakat Ns, Haggag RS, 2002. Spektrophotometric and polarographic Determination of Enalapril and Lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J.Pharm. Biomed. Anal* 31: 701-711.
- Chobanian Aram V, George L. Bakris, Henry R. Black, William C. Cushman, Lee A. Green, Joseph L. Izzo, Jr, Daniel W. Jones, Barry J. Materson, Suzanne Oparil, Jackson T. Wright, Jr, Edward J. Roccella., 2016. *Sevent Report of the Joint National Alcommite on Prevention, Detection, Evaluation, and Blood Prssure.*

- Day RA, Underwood AL, 2001, *Analisis Kimia Kuantitatif*, Edisi 6, Terjemahan oleh Iis Sopyan, Penerbit Erlangga, Jakarta, 399.
- Gandjar IG, dan Rohman A, 2007. *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 378-406.
- Goodman, Gilman, 2014. *Dasar Farmakologi Terapi*, Edisi 6, Volume 2, Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 258-259.
- Iriawan, N., dan Astuti, S.P. 2006. *Mengolah Data Statistik dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. Yogyakarta. Penerbit ANDI.
- Jalalizadeh H, Souri E, Shafiee A, 2007, *Optimization of an HPLC Method for Determination of Gabapentin in Dosage Forms through Derivatization with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene*, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Medical Sciences, Iran, 1427-1430.
- Katzung BG, 2014. *Farmakologi Dasar & Klinik*, Edisi 12, Volume 1, Buku Kedokteran EGC, Jakarta, 187-188
- Khopkar SM, 2003, *Konsep Dasar Kimi Analitik*, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, 2016.
- Nuryanti, dan Salimy DH, 2008, *Metode Permukaan Respon dan Aplikasinya pada Optimasi Eksperimen Kimia*, Lokakarya Komputasi dalam Sains dan Teknologi Nuklir.
- Paraskevas G, Atta-Politou J, Koupparis M, 2002, *Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent*, *Laboratory of Analytical Chemistry*, 29:865-872.
- Pranoto BS, 2015, *Optimasi pH, Waktu Reaksi dan Suhu pada Reaksi Analapril maleat dengan 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzen yang Dianalisis secara Spektrofotometri*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya.
- Siswandono, Soekardjo B. 2000. *Kimia Medisinal 2*. Airlangga University Press. Surabaya, 328-331.

Sitorus M, 2009, *Spektroskopi: Eludasi Struktur Molekul Organik*. Yogyakarta, Graha Ilmu, 4,15,-17,25-26.

Sweetman SC, 2011, *Martindale: The Complete Drug References, 37th edition*, The Pharmaceutical Press, London, 1276-1277.

World Health Organization, 2013, *A Global Brief of Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis*, (online), (http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/ diakses 22-01-2016).

Yovanitanesya, 2016, Uji Kesesuaian system dan optimasi *mol rati* pada penetapan kadar enalapril terderivatisasi 1-fluoro-2,4-Dinitrobenzena secara HPLC, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya.