

**PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR
BROMHEXINE HCI DAN GUAIFENISIN PADA SEDIAAN
TABLET KOMBINASI MENGGUNAKAN METODE
KLT VIDEO DENSITOMETRI**

Any Noor Andiny

13171006



**SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG
JL. SOEKARNO HATTA NO. 754
BANDUNG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN
PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR
BROMHEXINE HCI DAN GUAIFENISIN PADA SEDIAAN
TABLET KOMBINASI MENGGUNAKAN METODE KLT
VIDEO DENSITOMETRI

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu


Any Noor Andiny

13171006

Bandung, Juli 2019

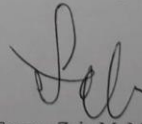
Menyetujui

Pembimbing Utama,



(Drs. Indro Pamudjo, M.Si., Apt)

Pembimbing Serta,



(Dr. Fauzan Zein M, M.Si., Apt)

ABSTRAK

PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR BROMHEXINE HCl DAN GUAIFENISIN PADA SEDIAAN TABLET KOMBINASI MENGGUNAKAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI

Oleh :

Any Noor Andiny

(13171006)

Bromhexine HCl dan guaifenisin merupakan kombinasi obat batuk untuk meningkatkan efek farmakologi dan efek terapi, bromhexine HCl yang berkhasiat menekan rangsangan batuk (mukolitik) sedangkan guaifenisin berkhasiat sebagai ekspektoran. Tujuan penelitian untuk melakukan validasi metode dan menetapkan kadar bromhexine HCl dan guaifenisin dengan metode KLT video densitometri. Fase diam yang digunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak metanol – air- as. asetat (45 : 55 : 2 v/v). Perekaman bercak menggunakan kamera mirrorless di bawah sinar UV 254 nm dengan analisis menggunakan *software* ImageJ dan mendapatkan nilai AUC. Hasil validasi menunjukkan nilai BD, BK, akurasi dan presisi dengan nilai berturut-turut pada sampel bromhexine HCl adalah 1.81 µg/mL, 6.05 µg/mL, 99.72% dan 0.34%. Sedangkan pada sampel guaifenisin adalah 16.65 µg/mL, 55.52 µg/mL, 99.74% dan 0.30%. Kadar Bromhexine HCl dan guaifenisin pada sampel adalah 87.7% dan 96.0%. Validasi metode analisis yang digunakan valid dan penetapan kadar guaifenisin memenuhi syarat kadar pada Farmakope Indonesia Edisi V 92014), sedangkan pada penetapan kadar bromhexine HCl tidak memenuhi syarat pada Farmakope Indonesia.

Kata Kunci: Bromhexine HCl dan Guaifenisin, KLT Video Densitometri.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BROMHEXINE HCl AND GUAIFENISIN CONTENT DETERMINATION METHOD IN DRUG COMBINATION TABLETS USING KLT DENSITOMETRY VIDEO METHOD

By :

Any Noor Andiny

(13171006)

Bromhexine HCl and guaiphenesin are the combination of cough medicine to increase the effect of pharmacology and therapy effect, bromhexine HCl used to decrease the cough stimulation (mucolytic) and guaiphenesin used as expectorant. This research aims to validate the method and determine the content of bromhexine HCl and guaiphenesin with KLT densitometry video method. Idle phase using GF₂₅₄ silica gel plate with motion phase of methanol – water-acetate acid (45 : 55 : 2 v/v). The spot was recorded with mirrorless camera below 254 nm UV light, analyzed with ImageJ software and get AUC. The results of validation shows BD, BK, accuration and precision of bromhexin HCl sample are 1.81 µg/mL, 6.05 µg/mL, 99.72% and 0.34% and on guaiphenesin sample are 16.65 µg/mL, 55.52 µg/mL, 99.74% and 0.30%. The contents of Bromhexine HCl and guaiphenesin samples are 87.7% and 96.0%. The validation of analysis method is valid and content determination of guaiphenesin is qualified by Farmakope Indonesia Edisi V 92014), while the content determination of bromhexine HCl is unqualified by Farmakope Indonesia.

Keywords: *Bromhexine HCl and Guaifenisin, KLT Densitometry Video.*

KATA PENGANTAR

Asalamualaikum wr, wb

Dengan memanjatkan puji dan sukur kehadiran Allah SWT atas segala berkah, rahmat serta karunia-Nya yang telah memberikan kemudahan sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tigas Akhir yang berjudul “Pengembangan Metode Penetapan Kadar Bromhexine HCl dan Guaifenisin pada Sediaan Tablet Kombinasi Menggunakan Metode KLT Video Densitometri” yang disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan STRATA 1 pada program studi Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya terutama kepada Allah SWT yang telah memberikan kelancaran dan kemudahan dalam penyelesaian laporan tugas akhir dan terwujudnya laporan tugas akhir ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari semua pihak, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak H. Mulyana, SH., M.Pd., MH.Kes selaku ketua Yayasan Adhi Guna Kencana.
2. Bapak Dr.Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes., Apt. selaku ketua Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

3. Ibu Lia Marlioni, M.Si., Apt selaku ketua Program Studi Strata Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
4. Bapak Drs. Indro Pamudjo, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu, saran selama penulis menyelesaikan Laporan Tugas Akhir ini.
5. Bapak Dr. Fauzan Zein M., M.Si., Apt selaku dosen Pembimbing serta yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing serta memberikan saran selama penulis menyelesaikan Laporan Tugas Akhir ini.
6. Seluruh dosen dan staff program studi Farmasi yang telah memberikan bantuan yang sangat berharga selama penulis mengikuti perkuliahan.
7. Bapak Andang Hadi Sopyan dan Ibu Omas Maesaroh selaku orang tua yang telah memberikan motivasi, semangat dan material dalam menyelesaikan perkuliahan.
8. Rekan-rekan se-Almamater dan semua pihak yang telah banyak membantu dalam penyusunan Laporan Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Laporan Tugas Akhir ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena ini penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak agar laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca dan pengembang ilmu pengetahuan.

Wasalamualaikum wr.wb

Bandung, Juli 2019

Penulis
Any Noor Andiny

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR GRAFIK	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
Bab I Pendahuluan.....	1
I. Latar Belakang.....	1
II. Rumusan Masalah	3
III. Tujuan Penelitian.....	3
IV. Manfaat Penelitian.....	3
V. Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
Bab II Tinjauan Pustaka	5
II.1 Batuk.....	5
II.2 Bromhexine HCl	8

II.3	Guafenisin.....	9
II.4	Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	10
II.5	KLT Video Densitometri.....	12
II.6	Software ImageJ	13
II.7	Validasi Metode Analisis	13
Bab III Metodologi Penelitian.....		20
Bab IV Alat dan Bahan.....		21
Bab V Prosedur Kerja		22
V.1	Pembuatan Larutan Baku Bromhexine HCl dan Guaifenisin.....	22
V.2	Pembuatan Larutan Baku Campuran Bromhexine HCl dan Guaifenisin.....	22
V.3	Penyiapan Kondisi Optimum Pemisahan.....	22
V.3.1.	Penyiapan Fase Diam.....	22
V.3.2.	Penyiapan Fase Gerak	23
V.3.3.	Penotolan.....	23
V.3.4.	Pengembangan	24
V.4	Visualisasi dan Perekam Bercak	24
V.4.1	Penampak Bercak dan Perekaman Bercak	24
V.3.5.	Analisa Kromatogram	26
V.3.6.	Pembuatan Kurva Kalibrasi	26
V.5	Validasi Metode Analisis	26
V.4.1	Uji Selektifitas	26
V.4.2	Linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi.....	27

V.4.3 Akurasi (ketepatan)	28
V.4.4 Presisi (kecermatan)	29
V.6 Penetapan Kadar Bromhexine HCl dan Guaifenesin dalam Sampel.....	30
V.5.1 Persiapan Sampel.....	30
V.5.2 Penetapan Kadar Sampel.....	30
Bab VI Hasil dan Pembahasan	32
VI.1 Pencarian kondisi optimum pemisahan.....	32
VI.2 Visualisasi dan Perekaman Bercak	33
VI.3 Pengukuran Bercak Secara Densitometri	34
VI.4 Pencarian Konsentrasi Terendah.....	35
VI.5 Validasi Metode	36
VI.5.1 Selektifitas	36
VI Kesimpulan dan Saran	44
VII.1 Kesimpulan.....	44
VII.2 Saran	44
Daftar Pustaka.....	45
LAMPIRAN.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. COA Bromhexine HCl dan Guaifenisin.....	49
Lampiran 2. Hasil Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi	51
Lampiran 3. Perhitungan Formula Sampel Simulasi	52
Lampiran 4. Uji Presisi.....	54
Lampiran 5. Uji Akurasi.....	57
Lampiran 6. Penetapan Kadar Bromhexine HCl dan Guaifenisin	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Struktur Kimia Bromhexine HCl	8
Gambar II.1	Struktur Kimia Guaifenesin	9
Gambar VI.1	Respon luas area puncak terhadap bercak bromhexine HCl dengan konsentrasi 30 $\mu\text{g/mL}$ dan 20 $\mu\text{g/mL}$	34
Gambar VI.2	Respon luas area puncak terhadap bercak guaifenesin dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$ dan 200 $\mu\text{g/mL}$	34

DAFTAR GRAFIK

Grafik VI.1 Kurva Kalibrasi Bromhexine HCl.....	37
Grafik VI.2 Kurva Kalibrasi Guaifenesin	37

DAFTAR TABEL

Tabel V.1 Komposisi Tablet Sampel Simulasi	28
Tabel VI.1 Nilai Rf dan Bercak pada Kondisi Eluen	32
Tabel VI.2 Hasil Perhitungan Akurasi untuk Sampel Bromhexine HCl dan Guaifenesin	39
Tabel VI.3 Data hasil perhitungan kadar bromhexine HCl dan guaifenesin	42

Bab I Pendahuluan

I. Latar Belakang

Batuk adalah sebuah gejala yang dialami tubuh. Namun batuk juga dapat dikatakan menjadi suatu penyakit dengan disertainya gejala yang lain. Batuk merupakan mekanisme pertahanan tubuh untuk menjaga pernapasan dari benda atau zat asing (Widodo dkk, 2009).

Banyak sediaan farmasi yang beredar di pasaran berupa sediaan kombinasi dari beberapa zat yang berkhasiat. Kombinasi obat dibuat untuk meningkatkan efek farmakologi dan efek terapinya (Damayanti, dkk, 2003). Salah satu obat batuk yang dapat dikombinasi yaitu guaifenesin dan bromhexine (Clarke, 2004).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian menggunakan teknik Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom C18 dan fase gerak campuran metanol-dapar fosfat 0,01M pH 3,3 perbandingan (60:40v/v), laju alir 1,0 mL/menit, elusi isokratik dengan deteksi UV pada λ 262 nm. Dalam kombinasi obat batuk terdapat guaifenesin yang berkhasiat sebagai ekspektoran dan bromhexine HCl yang berkhasiat menekan rangsangan batuk (mukolitik) (Tjay dan Rahardja, 2007). Banyak obat batuk yang omposisinya berupa gabungan antara penekanan batuk (bromhexine) dan ekspektoran (guaifenesin) (Moffet, dkk, 2004). Dipasaran kombinasi obat batuk bromhexine HCl dan guaifenesin tersedia dalam bentuk tablet dan sirup.

Metode analisis yang pernah digunakan untuk menetapkan kadar sediaan bromhexine HCl dan guaifenesin yaitu secara KCKT. Kelemahan dalam menggunakan metode KCKT yaitu terlalu pekat sehingga tidak menutup kemungkinan senyawa lain dapat terbaca. Pada penelitian ini dilakukan untuk mencoba mengembangkan dengan metode lain yaitu KLT video densitometri yang merupakan metode baru dari KLT. KLT video densitometri adalah metode analisis kualitatif dan kuantitatif yang berdasarkan analisis gambar. Kelebihan metode tersebut mampu memisahkan beberapa sampel secara bersamaan, dapat digunakan untuk menganalisis senyawa murni maupun dalam campuran, metode ini dapat dikembangkan menjadi metode alternatif bagi keterbatasan KCKT (Saragih, 2015).

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu analisis kualitatif dari suatu sampel berdasarkan perbedaan kepolarannya. Dalam pemeriksaan kuantitatif KLT dapat digunakan yang pada umumnya dibaca menggunakan video densitometri. KLT video densitometri merupakan bentuk yang modern dari KLT yang digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif yang berdasarkan analisis gambar. Sampel akan dipisahkan menggunakan KLT, bercak difoto menggunakan kamera dengan resolusi tinggi dan bercak dibaca pada aplikasi ImageJ. (Phattanawasin, dkk.,2011).

Penelitian ini menggunakan metode KLT video densitometri. Metode ini dapat dikembangkan sebagai metode alternatif dari metode KCKT. Densitometri adalah metode analisis instrumental yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang berupa bercak pada KLT. Sampel kombinasi obat bromhexine

HCl dan guaifenesin akan dipisahkan menggunakan KLT video densitometri dengan fase gerak metanol, air dan asam asetat sehingga dapat dilakukan validasi metode meliputi parameter selektivitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi (Indrayanto, 2000).

II. Rumusan Masalah

1. Apakah metode KLT video densitometri dapat digunakan untuk identifikasi senyawa bromhexine HCl dan guaifenesin?
2. Apakah metode KLT video densitometry yang dikembangkan dapat memenuhi parameter validasi yang memenuhi syarat?

III. Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan hasil parameter validasi dari sediaan tablet kombinasi Bromhexine HCl dan Guaifenesin menggunakan metode video densitometri.
2. Menentukan kadar bromhexine HCl dan guaifenesin dalam sediaan tablet menggunakan metode KLT video densitometri.

IV. Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan data outentik primer dari hasil penetapan kadar dengan metode KLT Video Densitometri
2. Diharapkan hasil penelitian dapat memberikan metode alternatif untuk penetapan kadar dan menjamin keamanan zat aktif dalam sediaan

V. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian : dilaksanakan di Laboratorium Analisis Farmakokimia Sekolah Tinggi Farmasi Bandung (STFB)
2. Waktu Penelitian : penelitian dilaksanakan mulai dari bulan Februari sampai Mei tahun 2019.

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Batuk

Obat merupakan sediaan atau paduan bahan yang siap digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan dan kontrasepsi (Depkes, 2005).

Batuk merupakan mekanisme pertahanan tubuh untuk menjaga pernafasan dari benda atau zat asing. Beberapa penyakit, seperti kanker, paru-paru, TBC, tifus, radang paru-paru, asma dan cacangan juga menampilkan gejala berupa batuk (Widodo, 2009). Jenis batuk berdasarkan produktivitasnya yaitu:

- 1) Batuk berdahak, yaitu batuk yang menghasilkan dahak atau lender (sputum) sehingga lebih dikenal dengan sebutan batuk berdahak. Batuk produktif memiliki ciri khas yaitu dada terasa penuh dan berbunyi. Batuk produktif sebaiknya tidak diobati dengan obat penekanan batuk karena lender akan semakin banyak terkumpul di paru-paru.
- 2) Batuk tidak berdahak, yaitu batuk yang tidak menghasilkan dahak (sputum), yang juga disebut batuk kering. Batuk tidak produktif sering membuat tenggorokan terasa gatal sehingga menyebabkan suara menjadi serak atau bahkan hilang.

Jenis batuk berdasarkan waktu berlangsung yaitu:

- 1) Batuk akut, yaitu batuk yang berlangsung kurang dari tiga minggu serta terjadi dalam satu episode. Batuk jenis ini umumnya disebabkan oleh flu dan alergi.
- 2) Batuk kronis, yaitu batuk yang berlangsung lebih dari tiga minggu atau terjadi dalam tiga episode selama tiga bulan berturut-turut. Batuk jenis ini biasanya disebabkan oleh asma, bronkitis dan tuberkulosis.

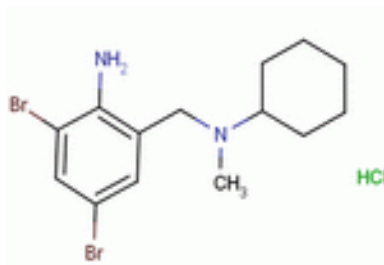
Mekanisme batuk dapat dibagi menjadi tiga fase yaitu fase inspirasi, fase kompresi dan fase ekspirasi. Batuk biasanya bermula dari inhalasi sejumlah udara, kemudian glottis akan menutup dan tekanan di dalam paru akan meningkat yang akhirnya diikuti dengan pembukaan glottis secara tiba-tiba dan ekspresi sejumlah udara dalam kecepatan tertentu. Fase inspirasi dimulai dengan inspirasi singkat dan cepat dari sejumlah besar udara, pada saat ini glottis secara refleks sudah terbuka. Setelah udara di inspirasi maka mulailah fase kompresi dimana glottis akan tertutup. Pada masa ini, tekanan di paru dan abdomen akan meningkat. Tertutupnya glottis merupakan ciri khas batuk. Kemudian terjadi fase ekspirasi, maka glottis akan secara aktif terbuka. Udara akan keluar dan menggetarkan jaringan saluran nafas serta udara yang ada sehingga menimbulkan suara batuk.

Mendiagnosa batuk adalah dengan mendengarkan suara batuk, ketika batuk yang dialami pasien disebabkan oleh virus atau terjadi infeksi maka akan diberikan antibiotik.

Terdapat beberapa pengobatan farmakologi yaitu dengan menggunakan obat antitusif, ekspektoran dan mukolitik.

- 1) Antitusif : pengobatan yang ditujukan untuk batuk kering, golongan obat ini bekerja sentral pada susunan saraf pusat dengan cara menekan rangsangan batuk dan menaikkan ambang rangsang batuk. Obat ini tidak sesuai jika diberikan pada pasien batuk berdahak karena akan menyebabkan dahak menjadi kental dan susah keluar. Contoh obat antitusif yaitu: dekstrometofan, codein, noskarin.
- 2) Ekspektoran : pengobatan yang ditujukan untuk batuk berdahak, golongan obat ini bekerja dengan cara meningkatkan sekresi cairan saluran pernafasan sehingga kekentalan dahak menjadi berkurang akibat dahak akan mudah dikeluarkan. Obat ini jika diberikan pada pasien batuk kering maka akan meningkatkan frekuensi batuk menjadi meningkat. Contoh obat ekspektoran yaitu: guafenisin
- 3) Mukolitik : pengobatan yang digunakan untuk batuk berdahak yang kental, seperti batuk pada bronchitis. Golongan obat ini bekerja dengan jalan memutus serat-sert mukopolisakarida atau membuka jembatan disulfide diantara makromolekul yang terdapat pada dahak sehingga kekentalan dahak akan berkurang dan dahak akan mudah keluar. Contoh obat mukolitik yaitu: bromhexine , ambroksol.

II.2 Bromhexine HCl

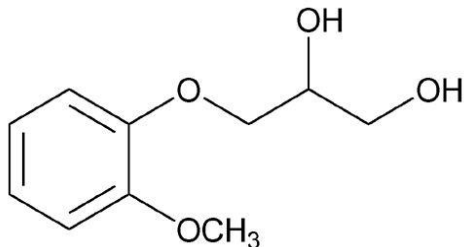


Gambar II.1 : Struktur Kimia Bromhexine HCl

Bromhexine HCl memiliki nama kimia N-(2-Amino-3,5-dibromobenzil)-N-metilsikloheksanmin hidroklorida [611-75-6], dengan rumus molekul $C_{14}H_{20}Br_2N_2HCl$ dan berat molekul sebesar 412,6 g/mol. Pemberian dari bromhexine HCl yaitu sediaan serbuk hablur, putih atau hampir putih dan kelarutannya sangat suka larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan dalam metilen klorida. Kadar bromhexine mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,5% (FI V, 2014).

Bromhexine HCl adalah obat yang digunakan untuk mengencerkan dahak pada saluran pernafasan atau yang disebut juga mukolitik. Obat ini bekerja dengan cara menghambat kerja sel yang menghasilkan dahak atau mucus sehingga menghasilkan dahak yang tidak kental dan mudah untuk dikeluarkan.

II.3 Guafenisin



Gambar II.2 : Struktur Kimia Guafenisin

Guafenisin memiliki nama kimia 3-(o-Metoksifenoksi)-1,2-propanadiol[93-14-1], dengan rumus molekul $C_{10}H_{14}O_4$ dan berat molekul 198,22 g/mol. Pemberian dari guafenisin merupakan serbuk hablur, putih sampai agak keabuan, memiliki bau khas yang lemah dan rasanya pahit. Guafenisin memiliki kelarut dalam air, dalam etanol, dalam kloroform dan dalam propilen glikol, agak sukar larut dalam gliserin. Titik lebur dari guafenisin antara 78° dan 82° namun rentang awal dan akhir peleburan tidak lebih dari 3° . Kadar yang harus ada dalam sediaan guafenisin yaitu mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% (FI V, 2014).

Guafenisin adalah obat yang digunakan untuk mengobati batuk akibat gangguan di saluran pernafasan seperti flu dan bronchitis. Obat ini bekerja dengan mengencerkan dahak di saluran pernafasan, sehingga melegakan pernafasan. Guafenisin atau disebut juga gliserin guaiakolat adalah derivat guaiakol yang banyak digunakan

sebagai ekspektoran dalam berbagai jenis sediaan obat modern (tjay dan Raharja, 2007).

II.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu jenis dari teknik kromatografi, dengan menggunakan fase diamnya berupa lapisan tipis yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempengan kaca, plat aluminium atau plat plastic. Fase gerak akan bergerak disepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara mekanik atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun. Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah, lebih murah dan peralatan yang digunakan lebih sederhana. Ada beberapa kriteria suatu zat agar dapat dianalisa dengan KLT yaitu:

- 1) Dapat dilarutkan dan dapat dielusi dengan fase gerak
- 2) Tidak bersifat volatil, sehingga tidak menguap selama proses elusi dan pengeringan lempeng KLT
- 3) Harus stabil selama proses kromatografi, baik terhadap cahaya, udara dan pelarut yang digunakan (Abdul Rohman, 2007).

Prinsip kerja dari kromatografi lapis tipis (KLT) yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Semakin dekat kepolarannya antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase diam yang digunakan biasanya yang memiliki ukura kecil, semakin kecil rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Fase diam yang sering digunakan yaitu silika dan serbuk selulosa (Adamovics, 1997). Absorben yang paling banyak digunakan dalam KLT adalah silika gel dan alumunium oksida. Silika gel umumnya mengandung zat tambahan kalsium sulfat untuk mempertinggi daya lekat. Zat ini digunakan sebagai absorben universal untuk kromatografi senyawa netral, asam, dan basa.

Fase gerak (eluen) adalah media angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Pelarut bergerak pada fase diam pada suatu lapisan berpori dengan adanya gaya kapiler. Pemilihan pelarut pengembang sangat dipengaruhi oleh polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan. Fase gerak yang digunakan harus memiliki kemurnian yang tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif, semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (gandjar dan Rohman, 2007).

Fase gerak (eluen) biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dari fase gerak yang dipilih harus dapat memberikan harga R_f analit antara 0,2-0,8 digunakan untuk memaksimalkan pemisahan.

Pelarut pada KLT yang memiliki kepolaran yang tinggi baik dalam satu larutan atau campuran maka akan semakin lama pelarut tersebut

menggerakkan senyawa polar naik dari titik awal penotolan. Jika senyawa non polar yang sedang dianalisis, maka tidak akan ada peningkatan yang nyata dalam jarak migrasi dengan peningkatan polaritas pada fase gerak (Watson,2009). Jarak anara noda dengan jarak yang ditempuh eluen biasanya dinyatakan dengan Rf (faktor retensi).

$$R_f = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}}$$

II.5 KLT Video Densitometri

Densitometri merupakan metode penetapan kadar suatu senyawa pada plat KLT yang menggunakan instrument TLC scanner. Pengukuran ini dilakukan dengan cara mengukur serapan analit dimana cahaya yang diukur dapat berupa cahaya yang dipantulkan atau yang diteruskan. Radiasi elektromagnetik yang datang pada plat diabsorpsi oleh analit, dan menghasilkan emisi berupa flouresensi dan fosforesensi. Keberadaan analit pada bercak akan menghalangi emisi dari fase diam (adsorben). Alat ini dilengkapi dengan detektorfotometer yang panjang gelombangnya dapat diatur dari 200-700 nm. (Poole, 2000).

Video densitometri merupakan metode dengan prinsip kerja pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik menggunakan komputer dengan kamera digital, sumber cahaya, untuk menerangi plat serta fokus gambar. Keuntungan dari metode ini dalam kromotografi lapis tipis dapat menghasilkan akuisisi data yang cepat dan simultan, desain instrumen sederhana, dan kompatibilitas dengan analisis data. Kekurangan dari metode ini yaitu jika muncul adanya

masalah pada pencahayaan lapisan selama akuisisi gambar, namun dapat diatasi dengan pencahayaan yang tepat sehingga dapat meningkatkan kontras gambar dan resolusi (Srivastava, 2011).

Prinsip kerjanya adalah sumber cahaya yang dipancarkan lampu yang akan memapari plat KLT. Terjadi interaksi dan menghasilkan emisi. Emisi ditangkap kamera digital dan emisi itulah yang akan diukur. Besar kecilnya emisi, tergantung dari kerapatan bercak. Kerapatan bercak tergantung dari kadarnya, baik dengan plat silika GF 254 atau pun yang lain.

II.6 Software ImageJ

ImageJ adalah suatu program yang dikembangkan oleh *National Institutes of Health* (NIH) Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan di Amerika Serikat yang terbukti paling sederhana, mudah dan serbaguna meskipun jenis software lainnya dapat juga dimanfaatkan. *Software* (perangkat lunak) ImageJ memakai format gambar dapat dalam bentuk JPEG atau TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan membedakan *background* atau dari zat pengganggu dengan memilik domain terbaik yaitu merah, hijau atau biru. ImageJ dapat menkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Kurniawan dkk, 2011).

II.7 Validasi Metode Analisis

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

untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Tujuan utama validasi metode adalah menjamin bahwa metode analisis yang digunakan dapat memberikan hasil analisis yang baik, validasi metode terbagi menjadi:

II.7.1 Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan suatu metode untuk dapat mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matrik sampel (Harmita, 2004). Selektifitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpanan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya yang dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Hermita, 2004).

Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektifitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektifitas. Selektifitas pada metode ini diukur dengan membandingkan nilai-nilai R_f dan spectrum baku standard an sampel pada spot yang sama (Pecsok dkk, 1976). Fakto rselektifitas (α) dan resolusi dapat dicari dengan :

$$\begin{aligned} \text{Faktor selektifitas } (\alpha) &= \frac{drA}{drB} \\ \text{Rs baku ataupun Rs sampel} &= \frac{2(drA-drB)}{(wA+wB)} \end{aligned}$$

Keterangan :

drA = Jarak yang ditempuh analit A (Rf amoxicilin trihidrat)

drB = Jarak yang ditempuh analit B (Rf kalium klavulanat)

wA = Lebar puncak analit A

wB = Lebar puncak analit A

II.7.2 Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan mendapatkan hasil respon dari absorbansi dan Area Dibawah Kurva (AUC) yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit di dalam sampel. Linieritas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis egresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematika data yang diperoleh dari hasil analit sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematika dalam pengujian linieritas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat kecil antara analisis terhadap konsentrasi analit, sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier.

Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 tergantung pada arah garis, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrument yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku standar atau SD (Standar Deviasi), dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer (Hermita, 2004).

II.7.3 Batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK)

Batas deteksi atau BD adalah jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko, batas deteksi merupakan parameter uji batas. Sedangkan batas kuantitasi atau BK adalah jumlah terkecil sampel yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang baik (Yuangsoi dkk, 2008).

Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrument atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrument batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrument batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali kemudian dihitung simpangan baku respon blanko dan formula yang dibuat dapat digunakan untuk perhitungan. Penentuan batas deteksi suatu metode dapat dihitung dengan mengukur perhitungan dengan rumus sebagai berikut :

$$BD = \frac{3Sy/x}{b}$$

$$BK = \frac{10Sy/x}{b}$$

$$Sy/x = \frac{\sqrt{\sum(y_1 - y')^2}}{n-2}$$

$$S \times 0 = \frac{sy/x}{b}$$

$$V \times 0 = \frac{s \times 0}{x}$$

II.7.4 Akurasi (ketepatan)

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan antara nilai terukur (nilai rata-rata hasil analisis) dengan nilai yang diterima (nilai kadar) sebagai nilai sebenarnya, kemudian dinyatakan sebagai persen perolehan kembali/ recovery (Gandjar dkk, 2007).

Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi dan metode penambahan baku. Dalam metode simulasi sejumlah analit bahan murni ditambahkan kedalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan yang sebenarnya.

$$\text{Akurasi} = \frac{\text{Nilai Pengukuran}}{\text{Nilai Sebenarnya}} \times 100\%$$

Syarat % *recovery* yaitu berada pada rentang 98-102%, kriteria akurasi sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (Hermita, 2004).

II.7.5 Presisi (Kecermatan)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diukur melalui penyebaan hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogeny.

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relative (koefisien variasi), presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan atau ketertiruan. Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analisis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang singkat. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Syarat dari presisi jika metode memberikan simpangan baku relative atau koefisien variasi yaitu 2% atau kurang (Harmita, 2004).

Pengukuran luas puncak pada sampel dilakukan sebanyak enam kali pengulangan dari tempat yang sama. Hasil yang telah didapat dinyatakan dalam persentase relatif standar deviasi (% RSD). Intraday presisi ditentukan pada tiga tingkat konsentrasi yang berbeda dari penanda yang berbeda, dilakukan dengan enam kali pengulangan pada hari yang sama. Sedangkan interday presisi ditentukan pada tiga konsentrasi yang berbeda dengan penanda, dilakukan dengan enam kali pengulangan 3 hari berturut-turut (Sethiya, 2014).

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

$$KV = \frac{SD}{\text{rata-rata}} \times 100\%$$

Keterangan :

SD = Simpangan baku

KV = Koefisien variasi