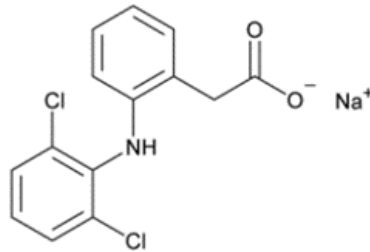


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Natrium Diklofenak

II.1.1 Sifat Fisikokimia



Gambar II. 1 Struktur Natrium Diklofenak

Rumus Molekul : C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂

Berat Molekul : 318,13

Pemerian : Serbuk hablur putih hingga hampir putih; higroskopik

Kelarutan : Mudah larut dalam metanol; larut dalam etanol; agak sukar larut dalam air; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter.

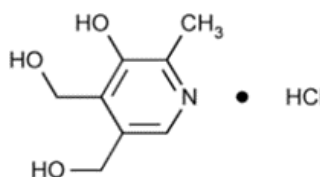
Kandungan : Natrium diklofenak mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0%

II.1.2 Mekanisme Kerja

Natrium diklofenak adalah obat anti inflamasi golongan non steroid yang mempunyai efek analgetik, anti inflamasi, serta antipiretik dengan mekanisme kerja secara reversibel menghambat siklooksigenase-1 dan 2 serta mampu menghambat sintesis prostaglandin.

II.2 Piridoksin HCl

II.2.1 Sifat Fisikokimia



Gambar II. 2 Struktur Piridoksin HCl

Rumus Molekul	: $C_8H_{11}NO_3.HCl$
Berat Molekul	: BM 205,64
Pemerian	: Hablur atau serbuk hablur putih atau hampir putih; stabil diudara; secara perlahan-lahan dipengaruhi oleh cahaya matahari.
Kelarutan	: Mudah larut dalam air; sukar larut dalam etanol; tidak larut dalam eter. Larutan mempunyai pH lebih kurang 3.
Kandungan	: Piridoksin HCl mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_8H_{11}NO_3.HCl$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

II.2.2 Mekanisme Kerja

Vitamin B6 atau piridoksin berfungsi sebagai koenzim yang bekerja pada keseimbangan metabolisme tubuh. Dalam metabolismenya, vitamin B6 akan dikonversi menjadi piridoksal-5-fosfat yang berfungsi sebagai koenzim dalam sintesis asam amino, neurotransmitter, sfingolipid, dan asam aminolevulinat.

II.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Teknik kromatografi ini merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan pada perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan suatu komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan (Sanagi, 1998).

Karena biaya yang relatif murah serta sederhana metode kromatografi lapis tipis dapat menjadi salah satu metode alternatif yang serbaguna dan mudah, selain memiliki kelebihan waktu elusi yang cepat, sensitivitas tinggi, metode ini juga memiliki reproduktivitas yang baik. Larutan sampel ditempatkan pada silika gel, kemudian plat KLT dimasukkan pada chamber yang berisi pelarut yang telah jenuh dengan selebar kertas saring. Setelah pelarut naik mendekati tanda batas pada plat KLT, plat kemudian diangkat dan dikeringkan setelah itu divisualisasikan menggunakan sinar UV (Wulandari, 2011).

Metode analisis kromatografi lapis tipis memiliki keuntungan utama jika dibandingkan dengan metode KCKT karena dapat digunakan untuk menganalisis beberapa sampel secara simultan

sehingga dapat menghemat waktu dan biaya analisis (Fajriani, 2008). KLT video densitometri merupakan bentuk modern dari KLT dimana KLT-Video Densitometri merupakan suatu metode analisis kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan pada analisis gambar (Fitriawati, 2016).

Suatu senyawa dapat dianalisis menggunakan KLT dengan syarat :

1. Dapat melarut serta mampu dielusi oleh fase gerak.
2. Tidak volatil, sehingga tidak akan menguap saat proses elusi berlangsung dan saat pengeringan lempeng KLT.
3. Bersifat stabil selama proses kromatografi, stabil terhadap cahaya, pelarut yang digunakan dan udara.

Pemisahan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini umumnya menggunakan fase diam berupa plat silika sedangkan untuk fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang akan dipisahkan. Larutan atau campuran larutan yang digunakan disebut dengan eluen. Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak yang digunakan (Fitriawati, 2016)

II.3.2 Fase Diam

Penjerap untuk KLT digolongkan menjadi 2 yaitu penjerap dari bahan silika gel dan alumina. Penjerap yang paling umum digunakan untuk KLT yakni silika gel, karena bersifat asam maka digunakan untuk pemisahan senyawa yang sifat asam. Sementara alumina memiliki sifat basa maka lebih sering untuk pemisahan senyawa yang memiliki sifat basa. Hal tersebut dilakukan agar mencegah terjadinya peningkatan yang kuat antara senyawa dengan penjerap akibat ikatan ion diantara keduanya. Selain silika gel dan alumina dapat juga menggunakan penjerap jenis lain seperti poliamida dan selulosa (Wulandari, 2011).

II.3.3 Fase Gerak

Untuk memperoleh kepolaran yang sesuai untuk pemisahan tertentu umumnya fase gerak diubah-ubah dengan cara kombinasi beberapa pelarut. Namun ada beberapa faktor yang perlu diperhatikan ketika mengkombinasi fase gerak yaitu bahwa hanya pelarut yang memiliki kepolaran yang serupa yang dapat dikombinasi agar memperoleh pemisahan yang optimal. Karena KLT merupakan teknik pemisahan yang sangat sensitif maka pemilihan fase gerak harus mempunyai kemurnian yang cukup tinggi. Daya elusi dari fase gerak yang dipilih harus mampu memberikan harga R_f analit antara 0,2 – 0,8 tujuannya untuk memberikan pemisahan

yang maksimal. Dalam penggunaan KLT polaritas dari fase gerak akan menentukan nilai R_f dari analit (Rohman, 2007).

Semakin tinggi kepolaran suatu pelarut atau campuran pelarut maka semakin lama pula pelarut tersebut menggerakkan senyawa polar naik dari titik awal penotolan. Jika yang dianalisis merupakan senyawa non polar, maka tidak akan ada peningkatan yang nyata dalam jarak migrasi dengan peningkatan polaritas pada fase gerak (Watson, 2004). Jarak pengembangan suatu senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai R_f dan hR_f .

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

II.3.4 Sistem Kromatografi Natrium diklofenak dan Piridoksin HCl

Sistem Kromatografi	Rf	
	Natrium diklofenak	Piridoksin HCl
TA	0,90	0,59
TD	0,25	
TE	0,12	0,15
TF	0,27	
TG	0,29	
TAD	0,47	
TAE	0,90	0,75
TAJ	0,40	
TAK	0,64	
TAL	0,84	
TB		0,00

TC		0,08
TL		0,05
TAF		0,67

Sumber : Buku Clarke's Analysis of Drug and Poisons Edisi 4 Tahun 2004

Sistem TAE

Fase diam : Silika gel G, tebal 250 μm

Fase gerak : Methanol

Sistem TA

Fase diam : Silika gel G, tebal 250 μm

Fase gerak : Etil asetat-methanol-ammonia solution

II.4 KLT Densitometri

Densitometri merupakan instrumentasi metode analisis berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang memunculkan noda (bercak) pada plat KLT. Antara interaksi radiasi elektromagnetik dan noda pada plat KLT ditentukan oleh transmisi, adsorpsi, pantulan (refleksi) pendar flour atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Metode ini salah satu metode untuk pengukuran kadar suatu senyawa pada lempeng KLT, menggunakan software imageJ, pengukuran ditentukan berdasarkan serapan analit (yang diukur berupa pantulan cahaya yang diteruskan).

Instrumen dari KLT densitometri ini komplit dengan seperangkat optik, sumber cahaya serta detektor seperti pada spektrofotometer. Keuntungan utama analisis secara KLT Densitometri adalah memerlukan waktu lebih singkat dan lebih murah biaya operasionalnya dibandingkan KCKT (Watson, 2004).

Pada densitometer ada 3 sumber radiasi tergantung dari panjang gelombang yang digunakan. Lampu tungsten digunakan untuk mengukur daerah sinar tampak (400-800 nm) dan untuk pengukuran daerah Ultraviolet (190-400 nm) digunakan lampu deuterium. Zat yang berpendar sendiri (*self-fluorescence*) diukur fluoresensinya menggunakan lampu uap merkuri bertekanan tinggi yang memiliki panjang gelombang antara 254–578 nm (Deinstrop, 2007).

Uji kualitatif dengan metode KLT densitometri dengan cara membandingkan nilai faktor retensi (R_f) senyawa dengan faktor retensi baku standar. Sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan membandingkan luas area bercak yang timbul pada analit dengan luas area bercak standar (Wulandari, 2011).

II.5 KLT Video Densitometri

Prinsip metode KLT video densitometri berdasarkan pada pemindaian optik secara elektronik, menggunakan komputer yang disertai dengan sumber cahaya, video digital, monokromator dan optik yang tepat untuk menyinari plat KLT dan memfokuskan gambar pada *charge-coupled* (CCD) kamera video. Hal utama yang menarik dari video densitometri dalam mendeteksi kromatografi lapis tipis yakni akuisisi data yang cepat serta dapat dilakukan secara simultan, desain instrument yang sederhana, dan peningkatan sensitivitas dan kompatibilitas dengan analisis data (Fitriawati, 2016).

II.5.1 Peralatan KLT Video Densitometri

Penetapan kadar pada metode KLT video densitometri terdapat empat tahapan utama yakni:

- a. Penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan micro syringe, microcaps atau micropipettor.
- b. Pengambilan data menggunakan kamera digital.
- c. Kuantifikasi menggunakan software pengolah gambar yakni *ImageJ*.
- d. Diaplikasikan ke dalam persamaan matematika yang sederhana untuk mengubah data mentah ke dalam bentuk linear.

II.5.1.1 Peralatan

1. Plat KLT

Plat silika gel merupakan fase diam pada kromatografi lapis tipis, fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendar flour dalam sinar ultraviolet.

2. *Applicator camag*

Standar dan sampel larutan masing-masing diambil 5 μL , diaplikasikan pada plat KLT menggunakan *aplicator camag* Linomat V dengan pengaturan lebar 8 mm, jarak antar pita 3mm, menggunakan *microsyringe*.

3. Kamera digital

Setelah dielusi plat lalu difoto menggunakan kamera digital. Foto tersebut disimpan bawah sinar UV 254 nm. Untuk hasil yang baik, pada saat difoto plat tidak memerlukan pencahayaan yang sangat terang, cukup mengatur cahaya serta kontras pada kamera.

4. *Software*

Setelah diperoleh data dari setiap senyawa selanjutnya menggunakan ImageJ, untuk mendapatkan nilai luas area puncak yang dihitung dari luas puncak pada senyawa tersebut. Penyerapan cahaya terhadap senyawa pada plat ini mengikuti hukum Lambert-Beer kemudian data yang diperoleh dihitung menggunakan metode matematika sehingga diperoleh kurva standar yang diharapkan pada suatu metode analisis.

II.6 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).

Parameter Analisis

II.6.1 Selektivitas (Spesifisitas)

Selektivitas didefinisikan sebagai derajat penyimpangan metode terhadap sampel yang mengandung bahan seperti cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, atau senyawa asing, lalu disesuaikan dengan hasil analisis sampel tanpa bahan tambahan (Harmita, 2004).

II.6.2 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas diperoleh dengan cara membuat kurva kalibrasi hasil plot serangkaian konsentrasi terhadap respon puncak.

Parameter analisis dinyatakan memenuhi syarat jika terdapat hubungan yang linier maka digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $y = bx + a$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y), menggunakan bantuan kalkulator ataupun perangkat lunak komputer.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_1 - y)^2}{n-2}}$$

II.6.3 Sensitifitas (Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi)

Nilai BK merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi sedangkan nilai BK adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada tingkat akurasi dan presisi yang baik. Koefisien variasi fungsi yang didapat dinyatakan memenuhi persyaratan apabila nilainya $< 2\%$ (Asnawi et al., 2017).

Pada analisis dengan instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula dibawah ini dapat digunakan untuk perhitungan, dengan menggunakan rumus:

$$BD = (3S_{y/x})/b$$

$$BK = (10 S_{y/x})/b$$

$$S_{x0} = (S_{y/x})/b$$

$S_{y/x}$ adalah simpangan baku dari intercept dan merupakan kemiringan dari kurva standar (slope) (Harmita, 2004).

II.6.4 Uji Perolehan Kembali (Akurasi dan Presisi)

Akurasi atau kecermatan merupakan ukuran dimana menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis terhadap kadar senyawa sebenarnya. Akurasi disebut sebagai persen perolehan kembali (*recovery*). Untuk menentukan uji perolehan kembali terdapat dua cara, dapat menggunakan metode simulasi (*spiked placebo recovery*) atau metode penambahan standard (*addition method*) (Harmita, 2004). Dalam kedua metode tersebut persen perolehan kembali dinyatakan dalam rasio antar hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

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

Presisi adalah derajat kesesuaian di antara masing-masing hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang kali pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2004)

Sesuai dengan ICH (*International Conference on Harmonisation*), presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu : keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*). Parameter-parameter seperti simpangan baku (SB),

simpangan baku relatif (*relative standard deviation*), dan derajat kepercayaan haruslah dikalkulasi untuk mendapatkan tingkat presisi tertentu. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2004)

- a. Standar Deviasi (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

- b. Koefisien Variasi (KV)

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