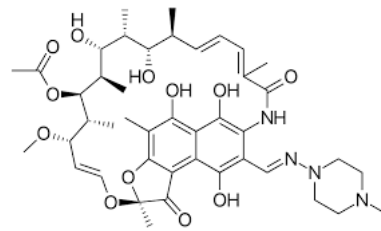


BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rifampisin



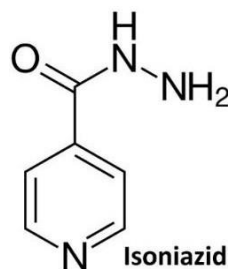
Gambar 2.1 Struktur Rifampisin

Sumber: Farmakope Indonesia edisi VI

Definisi. Obat ini bersifat bakterisidal. Rifampisin merupakan obat yang sangat efektif untuk pengobatan tuberkulosis dan sering digunakan bersama isoniazid untuk terapi tuberkulosis jangka pendek (FK UI, 2004). Selain mikobakteria, rifampisin juga membasmi bakteri gram positif dan gram negatif (Gery Schmitz et al, 2003). Mekanisme Kerja. Obatnya yaitu menghambat sintesis RNA bakteri dengan mengikat sub unit beta dari RNA polimerasi yang tergantung DNA dan memblokir transkripsi RNA (Aberg *et al*, 2009).

Dalam Farmakope Indonesia edisi VI, terdapat sediaan Rifampisin ada yang berbentuk tunggal ada yang kombinasi dengan obat lain. Pemerian Serbuk hablur, coklat merah. Kelarutan Sangat sukar larut dalam air; mudah larut dalam kloroform; larut dalam etil asetat dan dalam metanol. Rifampisin mengandung tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 103,0% $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, dihitung terhadap zat kering. (Depkes RI, 1995).

2.2 Isoniazid



Gambar 2.2 Struktur Isoniazid

Sumber: Farmakope Indonesia edisi VI

Isoniazid merupakan obat lini pertama dalam pengobatan tuberkulosis. Fungsi obat ini yaitu menghambat produksi asam mikolat, komponen dinding sel bakteri. Mekanisme kerja isoniazid yaitu berpengaruh terhadap proses biosintesis lipid, protein, asam nukleat dan glikolisis. Diminggu pertama isoniazid sangat penting terutama pada bakteri yang cepat

membelah dan sifat dari obat ini bakterisidal. Isoniazid mengandung tidak lebih dari 98,0% $C_6H_7N_3O$ dan tidak lebih dari 102,0% $C_6H_7N_3O$ saat diuji untuk zat kering. Pemerian Tidak berwarna atau putih, atau serbuk putih hablur; tidak berbau, perlahan-lahan dipengaruhi oleh udara dan cahaya. Mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, sukar larut dalam kloroform, dan sangat sukar larut dalam eter (Depkes RI, 1995).

2.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan semua metode pemisahan, berdasarkan distribusi senyawa antara dua fase yang terpisah. Dalam kromatografi lapis tipis satu fase dipasang pada pelat atau fase diam dan fase lainnya bergerak dan bermigrasi melalui fase diam (fase gerak), selama proses mengembangkan kromatografi campuran akan dipisahkan distribusikan antara fase diam dan fase gerak (Wilson, 2011). Umumnya metode KLT menggunakan fase diam berbasis silika dan fase geraknya sesuai dengan jenis sampel yang diinginkan (Gandjar dan Rohman, 2007). Kelebihan KLT adalah waktu yang terbatas dan sumber daya yang terbatas. Senyawa atau sampel dapat mengikuti kemurniannya dari timbulnya bercak ataupun bercak pada plat yang akan dibandingkan dengan standar baku atau jumlah puncak kromatogram KLT.

Pemisahan kromatografi lapis tipis ada dalam proses adsorpsi atau partisi. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan lembaran tipis yang dibuat dari kaca, alumunium, atau plastik tipis yang dilapisi fase diam atau silika gel. Dengan mengoptimalkan metode dan memanfaatkan instrumen komersial yang tersedia, akan mendapatkan hasil yang efisien dan konsisten. Penggunaan KLT dapat dimulai dengan penotolan sampel di awal fase diam kemudian dikeringkan. Pada chamber yang berisi fase gerak masukan ujung fase diam . Campuran komponen sampel akan meningkat pada tingkat yang bervariasi, seperti yang dijelaskan dalam pengembangan kromatogram. Setelah fase gerak mencapai tingkat yang diinginkan, fase diam dan fase gerak diambil kemudian keringkan, dan zona yang telah diidentifikasi dideteksi dengan menggunakan sinar ultraviolet. Ketika suatu zat berwarna atau berfluoresensi pendeteksiannya menjadi lebih mudah. Metode KLT didasarkan pada perbandingan nilai R_f dengan nilai R_f standar (Wulandari, 2011).

2.3.1 Fase Diam

Pada sistem KLT pemilihan fase gerak merupakan komponen yang penting. fase gerak akan berinteraksi dengan analit kemudian analit dan komponen lain yang berada dalam sampel terelusi (meninggalkan kolom menuju detektor). Karena kromatografi lapis tipis merupakan metode yang sangat peka, maka fase gerak harus memiliki tingkat

kemurnian yang tinggi. Polaritas fase gerak akan menentukan nilai R_f analit dalam metode kromatografi lapis tipis (Wulandari, 2011). Panduan pemilihan dan optimalisasi tahapan gerak:

- fase gerak memiliki kemurnian yang sangat tinggi.
- Daya elusi fase gerak diatur sedemikian rupa untuk menghasilkan nilai R_f berkisar antara 0,2- 0,8
- Polaritas fase gerak dapat menentukan kecepatan perpindahan dan menentukan nilai R_f dan untuk pemisahan penggunaan fase diam polar seperti gel.

2.3.2 Fase Gerak

Pada sistem KLT pemilihan fase gerak merupakan komponen yang penting. fase gerak akan berinteraksi dengan analit kemudian analit dan komponen lain yang berada dalam sampel terelusi (meninggalkan kolom menuju detektor). Karena kromatografi lapis tipis merupakan metode yang sangat peka, maka fase gerak harus memiliki tingkat kemurnian yang tinggi. Polaritas fase gerak akan menentukan nilai R_f analit dalam metode kromatografi lapis tipis (Wulandari, 2011). Panduan pemilihan dan optimalisasi tahapan gerak:

- fase gerak memiliki kemurnian yang sangat tinggi.
- Daya elusi fase gerak diatur sedemikian rupa untuk menghasilkan nilai R_f berkisar antara 0,2- 0,8
- Polaritas fase gerak dapat menentukan kecepatan perpindahan dan menentukan nilai R_f dan untuk pemisahan penggunaan fase diam polar seperti gel.

2.3.3 Sistem Kromatografi

Sistem TLC ini merupakan metode penyarian umum untuk nitrogen basa seperti sistem TA, TB, TC, TL, TAE, dan TAF. Sedangkan untuk asam dan senyawa netral yaitu sistem TD, TE, TD dan TD .

Tabel 2.1 Sistem Kromatografi

Sistem kromatografi	RF	
	Rifampisin	isoniazid
TA	0,79	0,47
TB	0,11	
TC		0,11
TAE	0,83	0,55
TE	0,76	0,29
TF		
TAL		0,47
TD		
TAD		0,18
TAJ		0,09
TAK		0,03

Sistem TA

- Fase diam: Silica gel G, tebal 250 μ m
- Fase gerak: Methanol–strong ammonia solution (100 : 1.5)

Sistem TE

- Fase diam: Silica gel G, tebal 250 μ m
- Fase gerak: Ethyl acetate–methanol–strong ammonia solution (85 : 10 : 5)

2.4 Scanning Densitometri

Jenis Pemindaian Optik :

- a. Satu panjang gelombang, satu berkas cahaya
- b. Satu panjang gelombang, berkas cahaya ganda
- c. Dua panjang gelombang, berkas cahaya tunggal

Sumber Cahaya

- a. Lampu deuterium (190-400 nm)
- b. Lampu haloge tungsten (350-800 nm)
- c. Lampu xenon atau uap merkuri tekanan tinggi (254-578 nm).

2.5 Video Densitometri

Video densitometris menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari:

- a. kamera CCD beresolusi tinggi dengan zoom untuk memfokuskan dan memperbesar kromatogram jika diperlukan, dan sistem cahaya yang sesuai.
- b. Kamera terhubung ke komputer (biasanya PC) dan printer video.
- c. perangkat lunak untuk menyesuaikan pengaturan kamera, termasuk kecerahan, kontras,

dan intensitas.

d.Kromatogram dapat dicetak sebagai gambar pada printer video dan dapat diperbesar untuk mempelajari tentang konsentrasi analitik seperti densitometri.

2.6 Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang digunakan untuk menentukan analit secara kuantitatif atau kualitatif yang menggambarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan bercak noda analit yang terdapat dalam fase diam. Kemampuan suatu cahaya untuk mendeteksi senyawa molekular pada suatu bercak yang akan memasuki fase diam dikenal dengan interaksi elektromagnetik. KLT mengidentifikasi kemampuan cahaya yang diserap, diproses, dan diteruskan oleh bercak yang terbentuk selama analisis. Densitometer memiliki spektrum radiasi yang meliputi sinar UV (lampu deuterium) digunakan untuk koreksi daerah UV dengan rentang panjang gelombang 190-400 nm, sinar VIS (lampu tungsten) digunakan untuk koreksi sinar tampak dengan rentang panjang gelombang 400-800 nm, dan lampu uap merkuri dengan rentang panjang gelombang sempit untuk zat dengan rentang panjang gelombang 254-578 nm (Fabiana Meijon Fadul, 2019).

Pengukurannya dilakukan dengan TLC scanner untuk cara mengukur serapan analit (cahaya yang diukur biasa berupa cahaya yang dipantulkan ataupun yang diteruskan), pemadaman fluoresensi ke lapisan yang mengandung bahan berfluoresensi analit atau hasil reaksi analit. Hasil diperoleh dengan visualisasi kromatografi. Memperoleh data kuantitatif menggunakan metode densitometri KLT dengan membandingkan faktor retensi senyawa (R_f) dengan faktor retensi baku standar. Selain itu, penelitian kuantitatif dilakukan dengan membandingkan luas bercak yang muncul pada analit dengan luas bercak standar (Wulandari, 2011).

2.7 Kromatografi Video Densitometri

Metode Kromatografi Lapis Tipis sudah dilengkapi dengan video densitometri untuk menentukan secara kuantitatif dan kualitatif dimana prinsip dari alat ini adalah ketidakhomogenan interaksi radiasi pada pelat KLT, karena adanya penyinaran lampu UV. KLT Video densitometri adalah teknik yang digunakan untuk menganalisis data kuantitatif dan kualitatif melalui analisis gambar (Asnawi *et al.*, 2017). kelebihan video densitometri pada kromatografi lapis tipis meliputi pemrosesan data yang lebih cepat dan simultan, sensitivitas tinggi, kompatibilitas dengan analisis data, dan desain instrumen yang lebih baik. Parameter yang digunakan dalam uji kualitatif KLT video densitometri yaitu dapat dilihat berdasarkan nilai R_f pada gambar yang dihasilkan sedangkan parameter untuk uji

kuantitatif yaitu dengan melihat nilai AUC hasil dari pemindaian menggunakan perangkat lunak ImageJ. Untuk menetapkan kadar menggunakan metode kromatografi lapis tipis.

Ada empat sumber utama yang dapat dilihat pada video densitometri:

- A. analisis kuantitatif menggunakan tutup mikrocup atau mikropipet
- B. peningkatan gambar menggunakan kamera digital
- C. validasi menggunakan perangkat lunak ImageJ
- d. kolaborasi matematis untuk mengonversi data ke format linier.

2.7.1 Prinsip KLT Video Densitometri

KLT Video densitometri berprinsip pemindaian optik secara elektronik untuk menyinari pelat dan memfokuskan gambar ke dalam kamera video chargecoupled device (CCD). Keuntungan utama video densitometri untuk deteksi dalam kromatografi lapis tipis video densitometri meliputi mendapatkan data yang lebih cepat dan simultan, instrumen yang lebih kompak, sensitivitas tinggi, dan akurasi data. Video densitometri tidak dapat meningkatkan densitometri dari segi sensitivitas, resolusi, dan penggunaan berbagai panjang gelombang pengukuran (Fitriawati, 2016).

2.7.2 Perangkat Lunak Untuk Menganalisis Bercak

1. TLC analyzer

TLC analyzer merupakan sistem computer yang dapat memindai gambar digital yang berada pada plat KLT yang bisa diperoleh dalam pemindaian pada gambar dan membuat grafik komponen berwarna merah, hijau dan biru (pemindaian multispektral), Selain itu, perangkat tersebut dapat menghitung efektivitas optik yang digunakan untuk mengkalibrasi kurva. Untuk mendapatkan hasil analisa TLC analyzer, perhatikan bagian plat KLT yang tersinari Ultraviolet. Sinar ultraviolet memiliki panjang gelombang 254 nanometer dan mampu mendeteksi silika gel atau sampel. Silika gel akan menjadi fluoresensi cahaya hijau, namun sampel akan dapat menyerap dan menghlangi cahaya yang masuk kedalam silika gel (Savitri and Megantara, 2019)

2. Just-TLC

Perangkat lunak Just-TLC merupakan generasi baru yang digunakan untuk analisis KLT yang mampu menghasilkan data dari percobaan dengan menggunakan plat KLT. Perangkat ini dapat menghitung akurasi dengan tepat hanya dalam waktu beberapa menit. Alat ini dapat mendeteksi dan membandingkan kromatogram tiga dimensi, serta membandingkan hasil bercak atau noda yang sudah lama tertahan di KLT. Hasilnya dapat ditampilkan dengan menggunakan Microsoft Excel (Johnson *et al.*, 2007).

3. Imagej

Image J adalah salah satu perangkat lunak yang diluncurkan oleh *National Institutes of Health* (NIH) yang telah terbukti paling sederhana dan mudah. Perangkat lunak ini menggunakan format gambar berbentuk JPEG atau TIFF (Popovic and Sherma, 2014).

4. Sorrbfil Videodensitometri

Sorrbfil dapat melihat bercak yang terdapat dalam bentuk gambar plat. Drop lintasan untuk menentukan titik terang pada suatu tempat. Garis lurus berwarna merah dan biru, menggunakan alat tersebut untuk menentukan daerah bercak, menentukan jumlah disekitar bercak pada plat untuk menyesuaikan posisi disekitar bercak yang berada pada plat untuk menyesuaikan posisi disekitarnya (Pattanawasin dkk.,2012).

2.7.1 Kelebihan KLT Video Densitometri

Video densitometri mampu memvisualisasikan bentuk berupa kromatogram dan dapat digunakan untuk berbagai sampel dengan perawatan dan biaya operasional yang rendah (Lin, 2000). Metode KLT Video Densitometri dapat dikembangkan secara bebas bagi kebutuhan komersial dan dapat dijadikan pilihan KLT densitometri (Wulandari, 2011).

2.8 Validasi Metode

2.8.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan untuk menghitung zat tertentu secara akurat dan terdapatnya komponen lain dalam susunan sampel. Selektivitas didefinisikan sebagai penyimpangan metode yang diterapkan pada sampel yang mengandung bahan seperti cemaran, terurai, senyawa sejenis, atau senyawa asing, sebelum diterapkan pada sampel yang tidak mengandung bahan tambahan (Harmita, 2004).

2.8.2 Uji Sensitifitas

Persamaan garis regresi linier yang digunakan untuk menghitung Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK). Nilai BK merupakan jumlah analit terkecil dalam ilustrasi yang dapat dideteksi secara kuantitatif pada tingkat kemurnian serta presisi yang baik.

$$Q \frac{KxSb}{Sl}$$

Q : LOQ atau LOD

K : 3 (LOD) dan 10 (LOQ)

Sb : simpangan baku respon analitik blanko

SI : arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b) pada

persamaan garis $Y = a + bx$

Nilai dalam pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, lalu untuk simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residu (Sy/x).

$$\text{Batas deteksi (LOQ)} = \frac{3 Sy/x}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOD)} = \frac{10 Sy/x}{b}$$

2.8.3 Linearitas

Linearitas merupakan pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran konsentrasi tertentu (Harmita, 2004). Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi (R) pada regresi linear $y = bc + a$ selain itu simpangan baku residual (Sy/x) juga harus dihitung sebagai parameter.

2.9 Uji Perolehan Kembali

Ketelitian atau presisi adalah metode yang diperlukan untuk mengetahui respon instrument terhadap suatu analit yang bersifat tetap atau keterulangan dari waktu ke waktu. Presisi diukur sebagai nilai simpangan baku relatif. Persyaratan presisi jika menghasilkan nilai RSD atau KV 2% atau kurang (Harmita, 2004).

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

2.9.1 Akurasi

Merupakan ukuran untuk menunjukkan derajat kedekatan pada hasil analitik dengan kadar analit yang sebenarnya, akurasi dapat dinyatakan sebagai persen perolehan kembali. Diharapkan nilai recovery mendekati 100%. Pernyataan ini bertujuan untuk mengetahui adanya kesalahan sistematis (Harmita, 2004).

2.9.2 Presisi

Uji Presisi atau kesesamaan diukur sebagai simpangan baku relatif (RSD) dan koefisien variasi (KV). Uji presisi atau kesesamaan menggunakan seri larutan sampel simulasi 100%. Sampel simulasi 100% dilakukan 6 kali perlakuan pada plat KLT masing-masing sebanyak 10 μ L. Lalu dikembangkan dalam chamber, selanjutnya plat KLT diangkat dan dikeringkan. Prosedur ini dilakukan tiga kali pada hari yang berbeda untuk menentukan presisi antara atau intermediate precision. Setelah plat KLT kering dilakukan visualisasi dan pengambilan gambar. Kemudian dilakukan analisis kromatogram sehingga diperoleh nilai respon luas puncak (AUC). Nilai AUC yang diperoleh kemudian dihitung

simpangan baku (SD) lalu dimasukkan kedalam persamaan untuk memperoleh nilai relative simpangan baku (RSD). Nilai RSD yang diperoleh harus kurang dari 2 % untuk mendapatkan presisi yang baik.

2.10 Penetapan kadar Rifampisin dan Isoniazid dalam sediaan tablet

2.10.1 Persiapan Sampel

Sesudah dilakukan validasi metode dan semua parameter sudah mencakup persyaratan maka selanjutnya dilakukan penetapan kadar kombinasi Rifampisin dan Isoniazid dalam sediaan tablet. Sampel yang digunakan merupakan sediaan tablet yang terdapat kombinasi obat Rifampisin dengan bobot 150 mg dan Isoniazid dengan bobot 150 mg. Ditimbang sebanyak 10 tablet lalu digerus sampai halus kemudian ditimbang setara dengan satu tablet. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan dilarutkan dengan pelarut methanol p.a sampai tanda batas. Divorteks selama 5 menit kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring. Pada penetapan kadar sampel ditotolkan sebanyak 5 µl larutan sampel secara triplo pada plat KLT yang telah disiapkan dan dikembangkan dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak. Lalu dilakukan visualisasi dan pengambilan gambar plat. Selanjutnya dilakukan analisis kromatogram untuk memperoleh nilai AUC Rifampisin dan Isoniazid.

2.10.2 Penetapan Kadar Sampel

Gambar yang disimpan selanjutnya dianalisis bercaknya menggunakan software ImageJ. Kemudian dipilih lajur konsentasi satu blok puncak lalu diatur lebar dan jarak scan/pemindaian yaitu dari titik penotolan sampel sampai pada batas eluen. Nilai AUC ditentukan dengan menampilkan terlebih dahulu densitogram dari masing-masing gambar pita KLT. Kemudian lakukan penandaan gambar KLT yang akan diolah. Dari masing-masing gambar bercak KLT akan menampilkan densitogram. Pada masing-masing dasar puncak densitogram yang dihasilkan dibuat baseline, sehingga akan dihasilkan nilai AUC yang diinginkan secara otomatis. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai luas area bawah kurva (AUC) dengan menggunakan Microsoft Excel sehingga akan diperoleh rata-rata nilai AUC untuk Ibuprofen dan Paracetamol. AUC yang didapatkan kemudian dihitung kadar Ibuprofen dan Paracetamol, nilai kadar yang didapat selanjutnya dibandingkan dengan nilai yang tertera pada etiket.