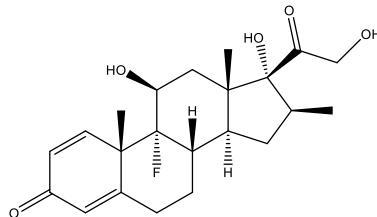


## Bab II Tinjauan Pustaka

### II.1. Betametason

#### II.1.1. Sifat Fisikokimia



Gambar II. 1 Struktur Kimia Betametason

Nama kimia : 9-Fluoro-11 $\beta$ ,17,21-trihydroxy-16 $\beta$ -methylpregna-1,4-diene- 3,20-dione

Rumus Molekul : C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>

Berat Molekul : 392,46

Pemerian : Serbuk Kristal putih sampai putih krem dilakukan dengan penguraian sekitar 240°.

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air: larut 1 dalam 75 etanol, 1 dalam 15 etanol hangat, dan 1 dalam 1100 kloroform. Sangat sedikit larut dalam eter serta sedikit larut dalam aseton dan metanol (Moffat, Anthony ; M. David Osselton; Brian, 2011).

### **II.1.2. Mekanisme Kerja**

Obat golongan glukokortikoid bekerja dengan mempengaruhi kecepatan sintesis protein. Molekul hormon akan memasuki sel melewati membran plasma secara difusi pasif. Reseptor protein yang spesifik dalam sitoplasma sel hanya bereaksi di jaringan target hormon ini dan membentuk kompleks reseptor-steroid. Kompleks ini mengalami perubahan konformasi, lalu bergerak menuju nukleus dan berikatan dengan kromatin. Ikatan ini menstimulasi transkripsi asam ribonukleat (ribonucleic acid, RNA) dan sintesis protein spesifik. Induksi sintesis protein ini yang menghasilkan efek fisiologi steroid (Suherman & Ascobat, 2007).

### **II.1.3. Efek Samping**

Penggunaan obat ini dapat menyebabkan gatal dengan kulit kemerahan, sulit bernapas, pembengkakan pada wajah, bibir, lidah atau tenggorokan. Efek samping yang serius masalah pada penglihatan, bengkak, berat badan meningkat dengan cepat, depresi yang parah, serta pankreatitis.

Menggunakan obat kortikosteroid dengan dosis tinggi dapat menyebabkan *syndrom Chusing* dengan berbagai gejala sebagai berikut: *moon face*, *striae* dan *acne* yang dapat pulih (reversibel) bila terapi dihentikan, tetapi cara menghentikan terapi harus dengan menurunkan dosis secara bertahap untuk menghindari terjadinya insufisiensi akut (Nelson, 1983).

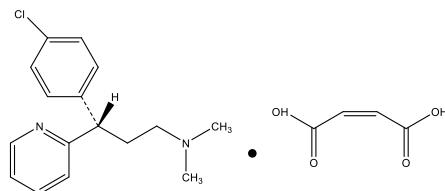
### **II.1.4. Penetapan kadar**

Zat aktif betametason dapat dibuat menjadi beberapa jenis bentuk sediaan farmasi seperti eliksir, injeksi, dan tablet. Betametason

mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% ( $C_{22}H_{29}FO_5$ ) jumlah yang tertera pada etiket. Penetapan kadar betametason dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kolom (4 mm x 30 cm) berisi bahan pengisi ODS dengan fase gerak campuran air : asetonitril P (63 : 37), volume penyuntikan lebih kurang 10 $\mu$ l dan deteksi dilakukan pada panjang gelombang 254nm (Departemen Kesehatan RI, 2014). Metode lainnya yaitu penetapan kadar betametason dalam tablet dengan spektrofotometri ultraviolet (Mustarichie, R., Musfiroh, I., dan Levita, 2014).

## **II.2. Deksklorfeniramin Maleat**

### **II.2.1. Sifat Fisikokimia**



Gambar II. 2 Struktur Kimia Deksklorfeniramin Maleat

Nama kimia : (S)-3-(4-chlorophenyl)-N,N-dimethyl-3-(pyridin-2-yl)propan-1-amine maleate

Rumus Molekul :  $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$

Berat Molekul : 390,87

Pemerian : Serbuk kristal putih tidak berbau, melindungi dari cahaya.

Kelarutan : Larut 1 dalam 1 air, 1 dalam 2 alkohol, 1 dalam 1,7 kloroform, dan 1 dalam 2500 eter. Dapat larut bebas pada metil alcohol dan diklorometana (Moffat, Anthony ; M. David Osselton; Brian, 2011).

### **II.2.2. Mekanisme Kerja**

Deksklorfeniramin maleat merupakan antihistamin yang menghambat reseptor H1. Antihistamin ini menghambat efek histamin pada pembuluh darah, bronkus, dan otot polos. Selain itu antihistamin juga bermanfaat untuk mengobati reaksi hipersensitivitas (Dewoto H.R, 2007).

Memblokir reseptor-H1 dengan menyaingi histamin pada reseptornya diotot licin dinding pembuluh dan dengan demikian menghindarkan timbulnya reaksi alergi. Khasiat lainnya mencuatkan bronchi, saluran cerna, kandung kemih dan Rahim(Tjay TH., Rahardja, 2002).

### **II.2.3. Efek Samping**

Efek samping yang umum terjadi adalah sedasi, efek sedasi ini bersifat individual, tergantung pada individu, dosis, dan jenis antihistamin yang diberikan. Efek samping lain berupa perasaan lemas, nafsu makan berkurang, mual, muntah, keluhan pada epigastrum, dan pusing. Efek samping yang berhubungan dengan efek sentral Anti Histamin-1 ialah vertigo, gugup, insomnia, gejala efek antikolinergik berupa retensi urin terutama pada orang tua, palpitasi, mulut kering, dan konstipasi. Umumnya efek samping ini timbul pada dosis tinggi (Munaf, 1994).

#### **II.2.4. Penetapan Kadar**

Zat aktif deksklorfeniramin maleat dapat dibuat menjadi beberapa jenis bentuk sediaan farmasi seperti larutan oral dan tablet. Deksklorfeniramin maleat mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% ( $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_6$ ) dari jumlah yang tertera pada etiket (Departemen Kesehatan RI, 2014). Penetapan kadar deksklorfeniramin maleat dapat dilakukan dengan ekstraksi cair-cair dan diukur serapannya pada Spektrofotometri UV dengan panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 264 nm, menggunakan asam klorida pekat (1 dalam 20) sebagai blanko (Departemen Kesehatan RI, 2014).

### **II.3. Kromatografi Lapis Tipis**

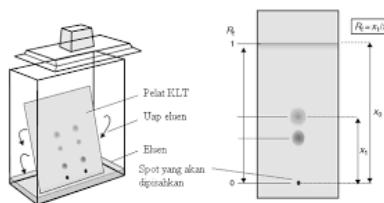
Prinsip dari kromatografi lapis tipis yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dari bentuk plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode analisis kromatografi planar dengan mekanisme adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Adsorpsi adalah proses dimana solut menempel pada fase diam, desorpsi adalah proses ketika posisi solut difase diam mulai tergantikan oleh fase gerak, dan elusi adalah proses dimana fase gerak melerutkan solut. Fase diam pada KLT dapat berupa silika gel, dan selulosa. Terdapat beberapa jenis silika gel berdasarkan pengikatnya seperti silika gel G, silika gel F, dan silika gel H. Untuk penyangga dari fase

diam dapat berupa kaca, plastik, atau alumunium. Terdapat 3 tahap untuk melakukan pemisahan menggunakan metode KLT yaitu penotolan sampel, pengembangan, dan identifikasi bercak (Rouessac, Francis and Rouessac, 2007).

Pada tahap penotolan sampel mula-mula dilarutkan pada pelarut yang melarutkan dan bersifat volatil. Terdapat 2 cara dalam penotolan sampel pada plat yakni secara manual yaitu menggunakan pipa kapiler, atau secara otomatis menggunakan mesin. Totolan pada plat KLT dapat berupa bercak titik maupun pita bergantung pada tujuan daroi analisis yang dilakukan. Pada tahap penotolan sampel ini terjadi mekanisme adsorpsi sampel pada plat KLT.

Tahap selanjutnya adalah pengembangan plat. Pengembangan dilakukan dengan menempatkan plat ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan oleh fase gerak yang akan digunakan. Posisi totolan sampel harus berada lebih atas daripada fase gerak agar bercak tidak rusak dan sampel tidak melerut dalam fase gerak. Pada pengembangan terdapat 2 mekanisme yang terjadi yaitu desorpsi dan elusi. Kedua mekanisme ini terjadi berdasarkan prinsip kepolaran senyawa. Desorpsi terjadi ketika fase gerak yang memiliki sifat lebih polar dari sampel mengantikan posisi dari sampel yang berada pada fase diam. Setelah terlepas, solut akan terbawa oleh fase gerak yang disebut dengan mekanisme elusi hingga mencapai jarak tertentu, kemudian plat dipindahkan dari bejana dan dikeringkan agar fase gerak menguap dari plat (Rouessac, Francis and Rouessac, 2007).



Gambar II. 3 Pengembangan plat KLT

Sumber: (Rouessac, Francis and Rouessac, 2007)

Visualisasi bercak dapat dilakukan dengan menggunakan penampak bercak maupun menggunakan spektrofotometer UV-visibel. Terdapat 2 jenis penampak bercak yaitu penampak bercak universal dan penampak bercak spesifik. Untuk visualisasi menggunakan spektrofotometer UV-visibel plat yang digunakan harus plat khusus yang mengandung senyawa yang dapat berfluoresensi dibawah sinar UV. Selain itu, untuk sampel yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-visibel harus mengandung kromofor agar nampak di bawah sinar UV.

Hasil dari pengembangan tiap komponen digambarkan dengan nilai faktor retensi ( $R_f$ ).  $R_f$  ini merupakan nilai yang menyatakan perbandingan antara jarak perpindahan senyawa terhadap jarak tempuh fase gerak dalam plat. Nilai  $R_f$  yang baik berkisar antara 0,2 – 0,8. Harga  $R_f$  dapat dihitung dengan persamaan :

$$R_f = \frac{x}{x_0}$$

Nilai  $x$  adalah jarak yang ditempuh komponen, sedangkan nilai  $x_0$  adalah jarak yang ditempuh fase gerak (Rouessac, Francis and Rouessac, 2007).

### **II.3.1. Fase Diam**

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata fase diam dan semakin sempit ukuran fase diam maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisisensi dan resolusinya (Gandjar dan Rohman, 2007).

### **II.3.2. Fase Gerak**

Fase gerak merupakan medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak dalam fase diam karena adanya gaya kapiler. Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak hanyalah pelarut bertingkat mutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multikomponen ini harus berupa suatu campuran yang sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga komponen (Stahl, 1985).

Eluen atau fase gerak yang digunakan dalam KLT dikelompokkan ke dalam dua kelompok, yaitu untuk pemisahan senyawa hidrofil dan lipofil. Eluen untuk pemisahan senyawa hidrofil meliputi air, metanol, asam asetat, etanol, isopropanol, aseton, n-propanol, tert-butanol, fenol, dan n-butanol sedangkan untuk pemisahan senyawa lipofil meliputi etil asetat, eter, kloroform, benzene, toluena, sikloheksana, dan petroleum eter (Stahl, 1985).

Untuk mendapatkan fase gerak yang baik maka dibutuhkan optimasi dari campuran fase gerak tersebut. Menurut Gandjar dan Rohman,

2007 berikut beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan fase gerak:

1. Fase gerak harus mempunyai kemurniaan yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
2. Daya eluasi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga Rf terletak antara 0,2-0,8 untuk mendapatkan pemisahaan yang maksimal.
3. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai Rf. Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter kedalam pelarut non polar seperti metal benzena akan meningkatkan harga Rf secara signifikan.
4. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat dan ammonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

#### **II.4. KLT Densitometri**

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak atau noda pada lempeng KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada lempeng KLT yang ditentukan adalah adsorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Densitometri

merupakan metode penetapan kadar suatu senyawa pada plat KLT, menggunakan instrument *TLC scanner*, pengukuran dilakukan dengan cara mengukur serapan analit (cahaya yang diukur dapat berupa cahaya yang dipantulkan atau yang diteruskan), pemadaman fluoresensi untuk lapisan yang mengandung bahan berfluorsensi analit atau hasil reaksi analit.

Keunggulan adalah dititikberatkan untuk analisis analit-analit dengan kadar sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahakn terlebih dahulu dengan KLT. Metode ini yang banyak digunakan dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif di bidang farmasi terutama di bidang analisis obat bahan alam (Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, 1990).

Instrumentasi KLT Densitometri dilengkapi dengan suatu perangkat optik, sumber cahaya dan detektor seperti halnya spektrofotometer. Keuntungan utama analisis secara KLT Densitometri adalah memerlukan waktu lebih singkat dan lebih murah biaya operasionalnya dibandingkan KCKT (Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, 1990).

Pada densitometer ada 3 sumber radiasi tergantung dari panjang gelombang yang digunakan. Lampu tungsten dugunakan untuk mengukur daerah sinar tampak (400-800 nm) dan untuk pengukuran daerah Ultaviolet (190-400 nm) diguanakan 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).

## II.5. KLT Videodensitometri

### II.5.1. Prinsip KLT Videodensitometri

Video densitometri merupakan metode yang mempunyai prinsip pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik, menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator dan optic yang tepat untuk menerangi plat dan fokus gambar ke perangkat *charge-coupled* (CCD) kamera video. Daya Tarik utama video densitometri untuk deteksi dalam kromatografi lapis tipis adalah akuisisi data cepat dan simultan, desain instrument sederhana tanpa bagian yang bergerak, peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data.

Video densitometri menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari:

1. Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom untuk fokus dan memperbesar kromatogram, jika diperlukan dan sistem pencahayaan yang sesuai.
2. Kamera ini dihubungkan ke komputer dan printer video.
3. *Software* untuk mengatur kamera dan semua parameter seperti kecerahan, kontras, keseimbangan warna dan intesitas.
4. Kromatogram dapat disajikan dalam bentuk gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometri.
5. Untuk analit yang lemah berfluoresensi, digunakan *aperture* kamera yang kecil ( $F: 22$ ) dapat digunakan dengan integrasi lama (Fried, 1999).

### **II.5.2. Peralatan KLT Videodensitometri**

Pada penetapan kadar menggunakan metode KLT Video densitometri terdapat empat sumber utama:

- a. Penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan jarum suntik, *microcap* atau *micropipettor*.
- b. Pengambilan data dengan kamera digital.
- c. Kuantifikasi dengan *software* pengolah gambar ImageJ (INH, USA).
- d. Diaplikasikan ke dalam persamaan matematika yang sederhana untuk mengubah data mentah ke dalam bentuk linear.

#### **Peralatan :**

##### **1. Plat KLT**

Plat yang digunakan adalah plast silika gel. Silika gel perlu ditambah gips (kalsium sulfat) untuk memperkuat pelapisannya pada pendukung. Sebagai pendukung biasanya lapisan tipis digunakan kaca dengan ukuran 20 x 20 cm, 10 x 20 cm, atau 5 x 10 cm. Pendukung yang lain berupa lembaran alumunium atau plastik seperti ukuran di atas yang umumnya dibuat oleh pabrik. Silika gel kadang-kadang ditambah senyawa fluoresensi, agar bila disinari dengan sinar UV dapat berfluoresensi atau berpendar, sehingga dikenal dengan silika gel GF<sub>254</sub> yang berarti silika gel dengan fluoresensi yang berpendar pada 254 nm.

##### **2. Microcaps**

Untuk penotolan bercak digunakan *microcap* dengan volume tetap (kapasitas 0,5 – 5  $\mu$ L), *microcap* dipilih karena

memiliki harga yang murah dan digunakan untuk sekali pakai tetapi memiliki kemampuan yang sangat baik dalam pembagian presisi. Data yang baik diperoleh ketika analit yang ditotolkan dilarutkan dalam pelarut yang kepolarannya lebih rendah dari fase gerak KLT dan ketika diperoleh spot yang melingkar. *Microcap* yang digunakan memiliki tingkat kesalahan  $\pm 1\%$ , namun kesalahan hanya berlaku jika pengisian dan pengosongan sampel pada *microcap* dilakukan dengan benar. Ketika mengisi *microcap microcap* harus benar-benar terisi penuh. Dan ketika menotolkan sampel pada plat *microcap* harus benar-benar sampai kosong. Bercak sampel harus benar-benar kering sebelum plat dimasukkan ke dalam *chamber*.

### 3. Kamera digital

Setelah plat dielusikan dalam *chamber*, kemudian plat difoto dengan menggunakan kamera digital. Foto-foto tersebut diambil di bawah sinar 254 nm dengan pencahayaan dari lampu ultraviolet 4W. Tidak ada kamera khusus yang diperlukan untuk teknik KLT video densitometri. Untuk menghasilkan hasil kuantifikasi yang baik, plat KLT pada saat difoto tidak memerlukan pencahayaan yang terlalu banyak. Pengaturan terbaik untuk kamera dan plat yang akan difoto ditentukan oleh kontras dan cahaya pada kamera tersebut.

### 4. *Software*

Setelah didapatkan beberapa data dari setiap zat aktif yang dilakukan dengan menggunakan ImageJ, untuk mendapatkan

kadar dapat dihitung dari kurva pada zat aktif tersebut. Adapun penyerapan cahaya oleh analit pada plat KLT ini mengikuti hukum Lambert-Beer dan data yang didapatkan membutuhkan metode matematika untuk menghasilkan kurva standar yang diinginkan untuk suatu metode analisis.

#### **II.5.3. Software untuk Menganalisis Bercak**

Perkembangan terbaru untuk kuantifikasi kromatogram secara densitometri adalah menggunakan “analisis gambar. Metode KLT video densitometri secara teknis didasarkan pada analisis gambar, istilah mengacu pada penggunaan kamera digital untuk mendapatkan gambar kromatogram pada plat, lalu mengupload hasil gambar tersebut pada komputer, dan evaluasi kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan berbagai program perangkat lunak yang tersedia tanpa perlu membeli instrument komersial. Ada beberapa pilihan perangkat lunak untuk analisis gambar, diantaranya adalah TLC Analyzer, ImageJ, Just-TLC, dan Sorbfil TLC.

Software yang digunakan yaitu Image J. 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 ataupun TIFF. Sebagai contoh, gambar dari plat KLT yang melibatkan fluoresensi *quenching* dengan analit atau deteksi oleh warna dengan reaksi warna biasanya akan memerlukan pemilihan domain warna yang tepat dan diperlukan gambar terbalik sehingga piksel analit

memiliki nilai-nilai positif terhadap *piksel background*, yang idealnya akan memiliki nilai kecil. ImageJ dapat mengkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Popovic Nevena, 2014).

#### **II.5.4. Keuntungan Videodensitometri**

Visualisasi berupa kromatogram, sederhana, dapat digunakan untuk berbagai sampel, mereduksi biaya operasional dan perawatan yang murah (Fried, 1999). Jika dibandingkan dengan metode KCKT, metode KLT memiliki kelebihan yaitu pelaksanaan yang lebih mudah dan murah. Serta peralatan yang digunakan lebih sederhana. Selain itu, metode KLT memberikan fleksibilitas yang besar dalam fase gerak, mempunyai berbagai teknik dalam berbagai pemisahan, proses kromatografi dapat diikuti dengan mudah dan semua komponen dalam sampel dapat dideteksi karena metode ini memungkinkan terjadinya pemisahan sampel secara serentak (Gritter et al., 1991).

#### **II.6. Validasi metode Analisis**

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya.

### **II.6.1. Selektivitas**

Selektivitas adalah kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang dapat mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemara, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (Harmita, 2004).

Faktor selektifitas ( $\alpha$ ) dan resolusi dapat dicari dengan:

$$\text{Faktor selektivitas } (\alpha) = \frac{dr_A}{dr_B}$$

### **II.6.2. Linearitas**

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam

sampel. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit (Harmita, 2004). Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $y = a + bx$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrument yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual ( $S_y$ ). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur

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

### **II.6.3. Uji Sensitifitas**

Batas Deteksi merupakan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi, tetapi tidak perlu ditetapkan secara kuantitatif dalam kondisi percobaan yang telah dinyatakan. Batas Kuantifikasi merupakan konsentrasi terendah analit didalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima dalam kondisi percobaan yang ditetapkan. Pada metode instrument, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku dan larutan blanko sampel, dengan menggunakan rumus:

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

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

Sy/x adalah simpangan baku dari *intercept* dan merupakan kemiringan dari kurva standar (*slope*) (Harmita, 2004).

#### **II.6.4. Akurasi**

Akurasi (kecermatan) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) dan metode penambahan bahan baku atau *standard addition method* (Harmita, 2004).

Menurut (Harmita, 2004) dalam metode adisi (penambahan bahan baku), sejumlah sampel yang dianalisis ditambah analit dengan konsentrasi biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan, dicampur, dan dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Dalam kedua metode tersebut persen perolehan kembali dinyatakan dalam rasio antar hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

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

#### **II.6.5. Presisi**

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)

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

b. Koefisien Variasi (KV)

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

## **II.7. Kondisi Optimum Pemisahan**

Dari beberapa pustaka didapatkan beberapa campuran fase gerak yang digunakan pada betametason dan deksklorfeniramin maleat dengan

metode kromatografi lapis tipis (KLT) yang dapat dilihat pada tabel II.1.

**Tabel II. 1 Sistem KLT yang digunakan dalam betametason dan Deksklorfeniramin Maleat**

Pustaka	Sampel	Komposisi Fase Gerak	Rf
(Selvi, 2016)	Dex-CTM	Metanol-kloroform-ammonia (10:5tetes:1tetes)	0,22
(Selvi, 2016)	Dex-CTM	Metanol-kloroform-ammonia (10:5tetes:2tetes)	0,32
(Dołowy & Pyka, 2014)	Betametason	Kloroform-metanol-asam asetat (99,5%) (28:5:0,5)	0,71
(Dołowy & Pyka, 2014)	Betametason	Kloroform-Metanol-Air (45: 11: 1)	0,69
(Dołowy & Pyka, 2014)	Betametason	Kloroform-Metanol-Air (38: 11: 2)	0,73