

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Nyeri kepala

Sakit kepala adalah rasa nyeri pada daerah atas kepala memanjang dari orbita sampai ke daerah belakang atau area oksipital dan kebagian daerah tengkuk (Akbar M,2010).

Prevalensi penderita sakit kepala karena migren berdasarkan hasil penelitian multisenter setara dengan rumah sakit pada lima rumah sakit di Indonesia, diperoleh hasil Migren tanpa aura 10%, Migren dengan aura 1,8%, *Episodik Tension type Headache* 31%, *Chronic Tension type Headache* (CTTH) 24%, *Cluster Headache* 0.5%, *Mixed Headache* 14% (Surya A,2012). Prevalensi rata-rata migren adalah 18%, Prevalensi *tensiontype headache* (TTH) adalah sekitar 52% dalam hidup, sedangkan 3% dari populasi umum mengalami *chronic headache* (Saleh N,2010).

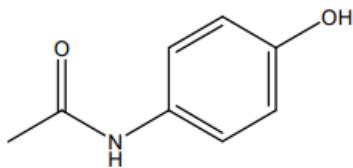
perbedaan jumlah yang mengalami migren pada wanita dan pria adalah 3:1. Pada saat beranjak dewasa, resiko remaja perempuan mengalami nyeri kepala dan migren adalah 1,5 dan 1,7 kali lebih besar dari pada remaja laki-laki. Pada prevalensi *tension-type headache*, perbandingan jumlah penderita laki-laki dan perempuan adalah 1:1 (Saleh N,2010).

2.2. Paracetamol

Parasetamol dengan nama lain *asetaminofen prime - hidroksiasetanilida*

Dengan rumus molekul $C_{8}H_{9}NO_2$ memiliki bobot molekul 151,6 gram/mol (Anonim, 1995). Rumus bangun parasetamol digambarkan sebagai berikut :

gambar 1.



gambar 2. 1 Setuktutr Paracetamol

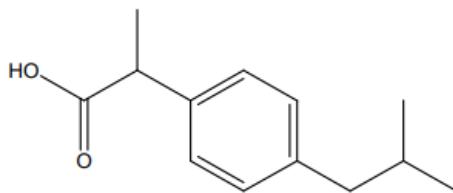
Parasetamol mengandung kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0% $C_2H_2NO_2$, dihitung terdapat zat anhidrat. Parasetamol adalah serbuk hablur putih, tidak berbau dan sedikit agak pahit (Anonim, 1995). Satu bagian parasetamol larut dalam 70 bagian air, 7-10 bagian etanol dan 13 bagian aseton, agak sukar larut dalam kloroform, praktis tidak larut dalam eter (Clarke, 1986). Parasetamol diindikasikan untuk sakit kepala, nyeri muskuloskeletal

sementara, dismenore dan demam. Parasetamol juga tidak memiliki aktivitas antinflamasi yang berarti dan kurang mengiritasi lambung dibanding dengan asetosal (Anonim, 2000). Tablet parasetamol mengandung parasetamol tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% jumlahnya yang tertera pada etiket. Penetapan kadar parasetamol dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan fase gerak campuran air-metanol P (3:1) (Anonim, 1995).

2.3. Ibuprofen

Ibuprofen dengan nama lain (R,S)-2-(*p*-Isobutilfenil) asam propionat memiliki rumus kimia C₁₃H₁₈O₂ dan berbobot molekul 206,28 gram/mol (Anonim, 1995). Kelarutan ibuprofen yang sangat kecil 46,9 µg/mL pada 370C dan 29,1 µg/mL pada 250C di dalam air sehingga peningkatan laju disolusi ibuprofen sangat diperlukan untuk dapat meningkatkan bioavailabilitas (Xu dkk., 2009). Rumus bangun ibuprofen dapat dilihat pada gambar berikut :

Gambar 2.



gambar 2. 2 Stuktur Ibuprofen

2.4. 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 didistribusikan antara fase diam dan fase gerak (berni Spangenberg, 2011).

Pemisahan kromatografi lapis tipis terjadi karena adanya proses adsorpsi atau partisi. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan lembaran tipis yang terbuat dari kaca, alumunium atau plastik tipis yang dilapisi dengan lapisan tipis fase diam atau yang sering digunakan adalah silika gel.

Peralatan dan bahan yang digunakan cukup sederhana yaitu chamber yang berisi pelarut dan lempeng kromatografi lapis tipis. Dengan optimasi metode dan memakai instrument komersial yang tersedia, akan mencapai pemisahan yang efisien dan kualitas yang akurat.

Penggunaan KLT dapat diawali dengan penutupan sampel pada ujung fase diam kemudian diamkan sampai mengering. Ujung fase diam dicelupkan kedalam chamber yang berisi fase gerak. Campuran komponen-komponen sampel akan berpindah dengan kecepatan yang beda-beda hal ini disebut dengan proses pengembangan kromatogram. Setelah fase gerak telah mencapai jarak yang ditentukan diambil fase diam dan fase gerak yang berada didalam lempeng dikeringkan dan zona yang telah dihasilkan dideteksi menggunakan sinar ultraviolet. Deteksi suatu senyawa akan lebih mudah ketika senyawa dapat berwarna atau berfluoresensi. Metode KLT didasarkan pada perbandingan nilai R_f yang dibandingkan dengan nilai R_f standar (Wulandari, 2011)

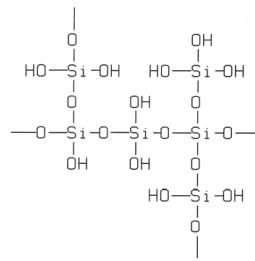
Hasil pengembangan menggambarkan dengan nilai faktor retensi (R_f). R_f merupakan nilai yang menyatakan perbandingan antara jarak perpindahan senyawa terhadap jarak tempuh fase gerak didalam plat dengan kisaran nilai adalah 0.2 – 0.8, dan dapat dihitung menggunakan persamaan

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

Dimana x merupakan jarak yang ditempuh komponen, dan nilai x_0 merupakan jarak yang ditempuh fase gerak.

2.4.1. Fase Diam

Pengoperasian kromatografi lapis tipis dapat menggunakan lapisan tipis silika atau alumina yang sesuai pada sebuah lapisan kaca atau logam. Silika gel merupakan fase diam yang umum digunakan, silika gel disebut juga sebagai asam silikat dan kieselgel yang merupakan bahan berpori amorf putih yang mengandung substansi yang dapat berfluoresensi pada sinar ultraviolet. Pemisahan terjadi terutama dengan ikatan hidrogen atau interaksi dipol dengan gugus silanol permukaan dengan menggunakan fase gerak lifofilik dan analit dipisahkan menjadi kelompok-kelompok sesuai dengan polaritasnya. Beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam pemilihan fase diam yang baik yaitu ukuran partikel, luas permukaan, volume pori-pori dan distribusi diameter (Sherma and Fried, 2003).



gambar 2. 3 Struktur Silika Gel

Struktur silika gel disatukan dengan ikatan silikon dan oksigen yang disebut siloksan kelompok. Gugus hidroksil pada permukaan bertanggung jawab atas adsorpsi dari sifat silika gel yang memberikan karakterisasi pemisahan(Wall, 2005).

2.4.2. Fase Gerak

Fase gerak adalah komponen yang sangat penting dalam suatu pemisahan, fase gerak akan berinteraksi dengan analit kemudian analit dan komponen lain yang berada dalam sampel terelusi (meninggalkan kolom menuju detektor).

Eluent merupakan fase gerak yang berperan dalam proses elusi untuk larutan umpan untuk melewati fase diam (adsorbent). Interaksi antara fase diam dengan fase gerak sangat menunjukkan terjadinya pemisahan komponen(Fharida, 2008).

Syarat dalam pemilihan dan mengoptimasikan fase gerak :

- Fase gerak memiliki kemurnian yang sangat tinggi.
- Daya elusi fase gerak diatur sedemikian rupa sehingga menghasilkan Rf berkisar 0,2-0,8
- Untuk memisahkan penggunaan fase diam polar seperti silika gel, maka polaritas fase gerak dapat menentukan kecepatan perpindahan dan akan menentukan nilai Rf.

2.4.2.1 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 II. 1 Kromatografi Paracetamol Ibuprofen

Sistem	Rf
kromatografi	paracetamol ibuprofen
TA	95
TB	00

TC		
TAE	77	75
TE	45	06
TF	32	57
TAL	73	93
TD	15	46
TAD	26	54
TAJ	30	59
TAK	05	76

Sistem TF

- Fase diam: Silica gel G, tebal 250 μm
- Fase gerak: Etil asetat.

Sistem TAD

- Fase diam: Silica gel G, tebal 250 μm
- Fase gerak: Kloroform-metanol

Sistem TAJ

- Fase diam: Silica gel G, tebal 250 μm
- Fase gerak: Kloroform-ethanol

2.5.Scanning densitometri

Jenis pemindaian optik:

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

Sumber cahaya:

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

2.6.Video densitometri

Video densitometri menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari:

- a. Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom untuk fokus dan memperbesar kromatogram, jika diperlukan dan sistem pencahayaan yang sesuai.
- b. Kamera ini dihubungkan ke computer (biasanya PC) dan printer video.

- c. Perangkat lunak untuk mengatur kamera dan semua parameter seperti kecerahan, kontras, keseimbangan warna dan intensitas.
- d. Kromatogram dapat disajikan dalam bentuk gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometri.
- e. Untuk analit yang lemah berfluoresen, digunakan aperture kamera yang kecil (F: 22) dapat digunakan dengan integrasi lama.

2.7.Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang digunakan untuk menentukan analit secara kuantitatif ataupun kualitatif yang didasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan bercak noda analit yang terdapat dalam fase diam. Interaksi radiasi elektromagnetik adalah kemampuan cahaya yang menempuh molekul senyawa dalam bercak yang timbul berada pada fase diam KLT menunjukkan kemampuan cahaya yang diabsorpsi, dipantulkan,ditransmisis oleh bercak yang timbul pada analit.

Densitometer memiliki sumber radiasi yang terdiri dari sinar UV (lampu deuterium) berguna untuk pengukuran diarea UV dengan panjang gelombang 190-400 nm, sinar VIS (lampu tungsten) digunakan untuk mengukur diarea sinar tampak dengan panjang gelombang 400-800 nm dan lampu uap merkuri dengan tekanan tinggi untuk zat yang berfluoresensi sendiri dengan panjang gelombang 254-578 (Elke, 2007).

Densitometri adalah metode menetapkan kadar dalam suatu senyawa pada plat KLT yang menggunakan instrument TLC scanner, pengukuran dilakukan untuk cara mengukur serapan analit (cahaya yang diukur bisa berupa cahaya yang dipantulkan ataupun yang diteruskan), pemadaman *fluoresensi* untuk lapisan yang mengandung bahan *berfluoresensi* analit atau untuk hasil reaksi analit. Hasil yang didapatkan berupa visualisasi berupa kromatografi, metode ini memiliki biaya operasional dan perawatan yang sederhana.

Uji kualitatif dengan metode KLT densitometri dengan cara membandingkan nilai faktor retensi (Rf) 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).

2.8.KLT 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. Pengaruh dari pengaturan sistem video-amaging adalah kualitas yang dihasilkan dari

pengambilan gambar. Efek yang berbeda dari pengaturan latar belakang kamera, baseline noise, sensitifitas, dan keterulangan dari pendekripsi akan mempengaruhi hasil pada pelat KLT maupun kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT) Hal ini dikarenakan, ketepatan dan sensitifitas dari analisa kuantitatif KLT dipengaruhi oleh pengaturan dasar alat video densitometri (Petrovic, dkk, 2000).

KLT Video densitometri adalah teknik yang diperlukan untuk analisis uji kualitatif dan uji kuantitatif dengan maksud didasarkan pada analisis gambar (Asnawi dkk.,2017).Kelebihan video densitometri dalam kromatografi lapis tipis mampu menghasilkan pengambilan data secara cepat dan simultan, mengalami peningkatan sensitivitas, kompatibilitas dengan analisis data, dan desain intrument yang sederhana. Tetapi jika muncul masalah terkait pencahayaan lapisan selama pengambilan gambar dapat diatasi dengan cara meningkatkan pencahayaan yang akurat sehingga bisa meningkatkan resolusi gambar dan kontras gambar (Srivastava, 2011).

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 KLT video densitometri ada empat sumber utama yang dapat dilihat yaitu :

- a. penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan microcap atau mikropipet
- b. pengambilan gambar dengan kamera digital
- c. kualifikasi menggunakan perangkat lunak ImageJ
- d. dilakukan kedalam persamaan matematika untuk mengubah data kedalam bentuk liniar

KLT video densitometri menggunakan sistem permulaan yang terdiri dari :

- a) Kamera CCD kualitas tinggi dengan pembesaran untuk fokus pada kromatogram.
- b) Kamera dihubungkan dengan komputer dan printer video
- c) Perangkat lunak yang dapat mengatur kamera dan batas kemampuan kamera seperti kecerahan, kontras, keseimbangan warna.
- d) Kromatogram bisa ditampilkan dengan bentuk gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometri.
- e) Jika analit kurang berfluoresensi maka digunakan ukuran kamera yang kecil.

2.8.1. Prinsip KLT video densitometri

KLT Video densitometri berprinsip pemindaian optik secara elektronik dengan menggunakan komputer yang dilengkapi dengan video digital, monokromator, sumber cahaya dan memakai optik untuk menyinari pelat dan memfokuskan gambar kedalam *charge-coupled device* (CCD) kamera video.

Kemampuan Tarik utama video densitometri untuk deteksi dalam KLT terletak pada pengambilan data yang cepat dan simultan, bentuk instrumen yang sederhana tanpa bagian yang bergerak, sensitivitas yang lebih tinggi, dan keandalan analisis data. Video densitometri tidak dapat menyaingi pemindaian densitometri dalam hal sensitivitas, resolusi, dan kegunaan berbagai pengukuran panjang gelombang (Fitriawati, 2016).

2.8.2. Perangkat Lunak untuk menganalisis bercak

Perangkat lunak yang dapat digunakan untuk pemilihan gambar meliputi TLC analyzer, Just-TLC, ImageJ dan sorrbfil videodensitometer (Popovic Nevena, 2014)

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 alat ini dapat menghitung kerapatan optik yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Untuk mendapatkan hasil analisis dari TLC analyzer harus diperhatikan apa yang terjadi pada plat KLT yang terkena sinar UV Sinar UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat mendeteksi silica gel atau sampel yang berada dipermukaannya. Silika gel akan berfluoresensi cahaya hijau sedangkan sampel dapat menyerap cahaya dan menghalangi cahaya yang menempuh silica gel (Victoria dkk.,2007).

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. Perangkat ini mampu mendeteksi dan membandingkan kromatogram tiga dimensi, membandingkan hasil dari bercak atau noda yang berada lama plat KLT serta hasil yang didapat bisa diekspor melalui microsoft exel (Johnson dkk.,2007)

3. Image J

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

4. Sorrafil Videodensitometri

Sorrafil dapat melihat bercak yang terdapat dalam bentuk gambar plat. Mempergunakan menu lintasan drop 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 (Pattanawasin dkk.,2012).

2.8.3. Kelebihan KLT Video Densitometri

Video densitometri mampu menvisualisasikan bentuk..berupa kromatogram dan dapat digunakan untuk berbagai sampel dengan perawatan dan biaya operasional yang rendah (Fried,1999). Dibandingkan dengan metode KCKT, metode kromatografi lapis tipis mempunyai kelebihan diantaranya yaitu penggunaanya lebih murah dan mudah, alat yang digunakan sederhana. Metode KLT videodensitometri dapat dikembangkan secara bebas bagi kebutuhan komersial dan dapat dijadikan pilihan KLT densitometry (Emawati dkk.,2018).

2.9. Validasi Metode Analisis

Validasi metoda analisis merupakan penggunaan pengukuran terhadap ukuran yang telah ditetapkan dengan didasarkan oleh percobaan laboratorium untuk menyatakan ukuran tersebut yang sudah masuk persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004).

Validasi dipakai untuk mendapatkan hasil perolehan data analisis yang baik dengan cara semua parameter yang tercantuk dengan metode analisis dipertimbangkan seperti cara pengambilan sampel, persiapan sampel, fase diam yang digunakan, fase gerak dan sistem deteksinya (Meri susanti, 2015).

Ukuran yang ditetapkan yaitu selektivitas, linearitas, uji sensitifitas (batas yang diketahui dan batas kuantitasi), uji perolehan kembali (presisi dan akurasi)

1. Selektivitas (spesifitas)

Selektivitas merupakan kemampuan untuk mengukur zat tertentu secara akurat dan seksama dengan adanya komponen lain yang ada dalam susunan sampel. Selektivitas dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan seperti cemaran, hasil urai, senyawa sejenis atau senyawa asing, lalu disesuaikan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan tambahan lain(Harmita, 2004)

2. Uji Sensitifitas (Batas deteksi dan batas kuantitasi) :

Batas yang diketahui merupakan jumlah atau konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat diketahui sedangkan batas kuantitasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang dapat memenuhi kriteria yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi.

Cara menentukan batas deteksi dapat dengan metode non instrumen, ditentukan dengan cara mengetahui analit didalam sampel dengan pengenceran bertahap dan metode instrumen untuk dihitung dengan cara mengukur respon blanko beberapa kali kemudian dihitung simpangan baku blanko (Arfah dkk.,2020)

$$Q = \frac{K \times Sb}{Sl}$$

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 linir $y = a + bx$, lalu untuk simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

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

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

3. Linearitas : tidak semua melakukan kurva baku, boleg pake boleh tidak

Linearitas merupakan penggunaan suatu metode analisis yang bertujuan untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran konsentrasi tertentu (Harmita, 2004).

4. Uji Perolehan Kembali (presisi dan akurasi)

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 (RSD) (Harmono, 2020). Persyaratan presisi jika menghasilkan nilai RSD atau KV 2% atau kurang (Harmita, 2004).

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

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

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

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar Terukur}}{\text{Kadar Diketahui}} \times 100\%$$