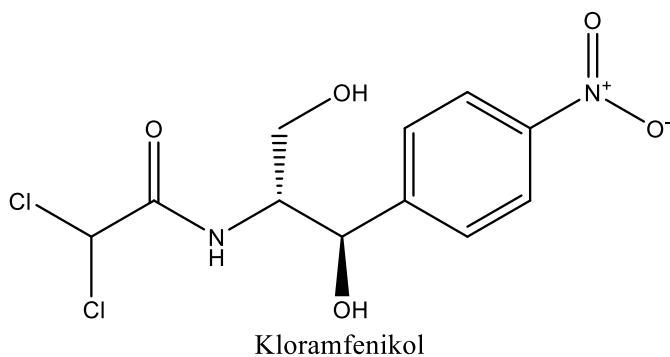


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kloramfenikol

Kloramfenikol adalah antibiotik bakteriostatik spektrum luas yang sangat efektif. Mekanisme kerja dari kloramfenikol adalah dengan menghambat aktivitas peptidil transferase dari subunit 50s ribosom bakteri secara reversible sehingga menghambat pembentukan peptida bakteri (Michael J, 2003). Struktur kimia kloramfenikol dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur kimia kloramfenikol

2.1.1. Sifat fisikokimia

Kloramfenikol merupakan senyawa amida yang mengandung beberapa gugus reaktif seperti gugus para-nitro ($p\text{-NO}_2$), dua gugus hidroksil ($-OH$), satu gugus amina ($-NH$), dan satu gugus karbonil ($C=O$) yang dapat membentuk ikatan hidrogen. Kloramfenikol bersifat basa dengan adanya gugus amina ($-NH$) (pK_a 8,69). Sedangkan MAA merupakan asam dengan adanya gugus karboksil ($-COOH$) (pK_a 4,66) (Atqa & Sianita, 2021). Berikut adalah sifat fisikokimia kloramfenikol:

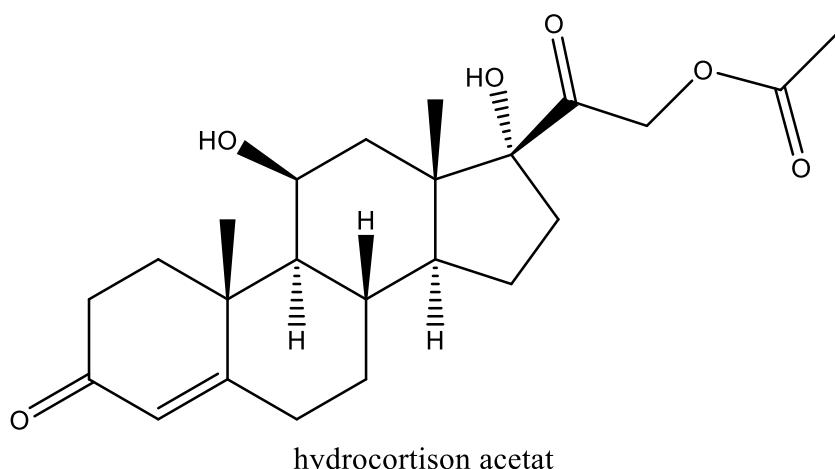
Nama Kimia	:	2,2-Dikloro-N-[(1R,2R)-1,3-dihidroksi-1-(4-nitrofenil)propan-2-il]asetamida
Rumus Kimia	:	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Berat Molekul	:	323,1 g/mol
Log P	:	1,14 (etanol-air)

- Pemerian : Hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan, larutan praktis netral terhadap lakmus P, stabil dalam larutan netral atau larutan agak asam.
- Kelarutan : Sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, propilen glikol, aseton dan etil asetat (Depkes RI., 2020).

2.2 Hidrokortison Asetat

Hidrokortison asetat adalah obat golongan kortikosteroid yang mempunyai daya kerja antialergi dan antiradang. Cara kerja kortikosteroid yaitu dengan mencegah reaksi alergi, menghambat sel epidermis dan mengurangi peradangan. Hidrokortison asetat dengan sediaan topikal dapat mengurangi radang, rasa gatal, dan rasa sakit pada kulit (Jafar et al., 2019).

Mekanisme kerja Hidrokortison asetat adalah menghambat degranulasi sel mast dan juga menginduksi penyempitan kapiler dengan mengurangi jumlah histamin yang diproduksi oleh basofil, sel mast dilepaskan. Hidrokortison menghambat fosfolipase A2, sehingga menghambat sintesis asam arakidonat, prekursor prostaglandin dan leukotrien, dan sintesis faktor pengaktif trombosit, di mana prostaglandin adalah mediator nyeri dan inflamasi. Struktur kimia hidrokortison asetat dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia hidrokortison asetat

2.2.1 Sifat fisikokimia

Berikut adalah sifat Fisikokimia Hidrokortison asetat:

Nama Kimia	:	(11 β)-11,17,21-trihidroksipregna-4-ena-3,20-dion[50-23-7]
Rumus Kimia	:	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
Berat Molekul	:	362.46 g/moL
Log P	:	1.61 (Ekatanol-air)
Pemerian	:	Serbuk hablur putih sampai praktis putih, tidak berbai, melebur pada suhu kurang dari 215° disertai penguraian.
Kelarutan	:	Sangat sukar larut dalam air dan eter, agak sukar larut dalam aseton dan etanol, sukar larut dalam kloroform (Depkes RI., 2020).

2.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode kromatografi yang umumnya ditetapkan secara luas karena keunggulan dalam kesederhanaan metodenya, prosedur yang cepat, dan tingkat keberhasilan yang tinggi. Keberhasilan dalam pemisahan menggunakan KLT sangat bergantung pada lokalitas proses bercak. Meskipun bercak pemisahan pada KLT umumnya tidak berwarna, pemisahan bercak yang berwarna dapat dilakukan secara visual. Penentuan lokasi bercak dapat dilakukan melalui pendekatan kimia dan fisika. Pendekatan kimia sering melibatkan reaksi bercak dengan pereaksi melalui penyemprotan untuk memperjelas bercak. Pendekatan fisika untuk menampilkan bercak termasuk pencacahan radioaktif dan fluoresensi menggunakan sinar ultraviolet (Nurdiani, 2018).

Prinsip kerja dari metode KLT yaitu “*like dissolve like*” yaitu suatu senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang polar dan akan terjadi sebaliknya jika

senyawa yang non polar akan larut dalam pelarut yang non polar. Proses KLT menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Pujiati et al., 2023).

2.3.1 Fase Diam

Fase diam yang diterapkan dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) berupa bahan penyerap atau adsorben. Sifat umum dari bahan penyerap yang digunakan pada KLT mirip dengan yang digunakan pada Kromatografi Kolom. Dalam KLT, dua sifat utama yang sangat relevan adalah ukuran dan homogenitas bahan penyerap, karena adhesi pada pembawa sangat dipengaruhi oleh kedua sifat ini. Partikel yang kasar tidak dapat dipisahkan dengan baik, sehingga untuk meningkatkannya, partikel yang lebih halus dapat digunakan. Biasanya, ukuran partikel yang digunakan berkisar antara 1 hingga 25 mikron (Nurdiani, 2018).

Bahan penyerap yang umum digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) melibatkan silika dan serbuk selulosa. Mekanisme utama dalam KLT, yang melibatkan pemindahan analit dari fase diam ke fase gerak dan sebaliknya, terdiri dari partisi dan adsorpsi. Lapisan tipis yang bertindak sebagai penyerap juga dapat terdiri dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodekstrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Rochman, 2021).

2.3.2 Fase Gerak

Fase gerak merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi hasil pemisahan zat. Fase gerak bergerak naik mengikuti cairan pengembang karena daya serap fase diam terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda berdasarkan tingkat kepolarannya dan hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan komponen menjadi senyawa murni (Romsiah & Utami, 2019).

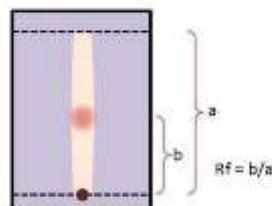
Pemilihan fase gerak dapat ditentukan melalui eksperimen trial and error hingga didapatkan kromatogram yang diinginkan. Pada kromatografi fase terbalik fase gerak bersifat polar dan akan terlalu lembut dulu. Sedangkan pada fase normal fase gerak bersifat kurang polar dan akan terelusii lebih dulu (Aulia et al., 2016).

2.3.3 Deteksi Bercak

Keberhasilan pemisahan dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sangat bergantung pada proses lokalitas bercak. Pada bercak yang berwarna, deteksi dapat dilakukan secara visual. Namun, bercak pemisahan pada KLT umumnya tidak memiliki warna yang terlihat. Identifikasi dapat dilakukan melalui pendekatan kimia, dan fisik . Pendekatan kimia seringkali melibatkan reaksi bercak dengan suatu pereaksi yang disemprotkan untuk membuat bercak menjadi lebih terlihat. Pendekatan fisika yang dapat digunakan untuk memvisualisasikan bercak melibatkan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet (Rochman, 2021).

1. Faktor Retensi (R_f)

Merupakan parameter karakteristik dalam kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis, harga ini menunjukkan kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram dan tetap konstan pada kondisi yang stabil, menjadikannya suatu ukuran karakteristik dan reproduksibel. R_f didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak tempuh suatu senyawa dari titik awal (b) dan jarak tepi depan pelarut dari titik awal (a) (Nurdiani, 2018). Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 R_f (Nurdiani, 2018)

Nilai R_f dari senyawa murni dapat dijadikan dasar perbandingan dengan nilai standar. Penting untuk dicatat bahwa nilai R_f yang diperoleh berlaku untuk kombinasi tertentu dari pelarut dan sorbennya, meskipun daftar nilai R_f untuk kombinasi pelarut dan sorben lainnya dapat diperoleh bersama-sama (Nurdiani, 2018).

2. Penetapan Rf

Faktor retensi (Rf) adalah rasio antara jarak tempuh suatu komponen dengan jarak tempuh eluen dalam suatu kromatografi. Nilai Rf bersifat sangat spesifik untuk suatu senyawa dalam eluen tertentu, dan dapat digunakan untuk membedakan antar senyawa dalam sampel. Senyawa dengan nilai Rf yang lebih tinggi menunjukkan polaritas yang lebih rendah, dan sebaliknya. Hal ini terjadi karena fase diamnya bersifat polar. Senyawa yang lebih polar cenderung terperangkap lebih banyak dalam fasa diam, yang mengakibatkan nilai Rf yang lebih rendah. Sebagai pedoman, nilai Rf yang optimal biasanya berkisar antara 0,2 hingga 0,8. Jika nilai Rf terlalu tinggi, ini menunjukkan bahwa polaritas eluen perlu dikurangi, dan sebaliknya.

2.4 Densitometri

Densitometri adalah teknik analisis kuantitatif yang umum digunakan dalam kromatografi lapis tipis. Metode ini mengukur intensitas cahaya yang diabsorpsi, dipantulkan, atau ditransmisikan oleh noda analit pada lempeng KLT. Teknik ini dapat dibagi menjadi dua jenis utama, yaitu scanner densitometri dan video densitometri, berdasarkan metode pengambilan dan analisis data, yang dimana scanner densitometri lebih cocok untuk analisis pelat KLT secara statis dengan presisi tinggi, sedangkan video densitometri ideal untuk aplikasi yang memerlukan kecepatan dan fleksibilitas dalam menganalisis distribusi densitas optik. Pemilihan teknik bergantung pada kebutuhan analisis dan jenis sistem yang diamati.

Interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda menghasilkan data berupa grafik puncak (densitogram) yang digunakan untuk menganalisis konsentrasi analit. Analisis kualitatif dijalankan melalui perbandingan nilai Rf dan spektrum densitometri bercak analit terhadap standar. Sementara analisis kuantitatif mengacu pada luas area noda yang dibandingkan dengan standar konsentrasi yang diketahui (Wulandari, 2011).

Dalam sistem densitometri modern, alat ini dilengkapi dengan sumber cahaya seperti lampu deuterium untuk sinar UV, lampu tungsten untuk cahaya tampak (VIS), dan lampu merkuri untuk fluoresensi. Sinar yang dihasilkan diubah menjadi

sinar monokromatik dengan panjang gelombang tertentu, yang selanjutnya diarahkan ke noda pada lempeng. Cahaya yang dipantulkan atau diteruskan oleh noda diterima oleh detektor, seperti pengganda foton, yang mengubahnya menjadi sinyal elektronik. Sinyal ini kemudian diolah menjadi grafik densitogram yang merepresentasikan intensitas dan luas noda. Alat ini mampu bekerja dalam dua mode yaitu reflektan (remisi) untuk noda di permukaan lempeng dan transmitan untuk noda pada lempeng transparan (Wulandari, 2011).

Keunggulan utama densitometri adalah kemampuannya melakukan analisis langsung pada lempeng tanpa memerlukan proses tambahan, presisi yang tinggi, dan waktu analisis yang lebih singkat. Metode ini juga fleksibel karena dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai jenis senyawa, baik yang secara alami menyerap sinar UV maupun yang memerlukan derivatisasi untuk meningkatkan sensitivitasnya (Wulandari, 2011).

2.5 KLT Video Densitometri

KLT video densitometri adalah metode analisis modern yang menggabungkan teknik kromatografi planar dengan teknologi pengambilan gambar digital. Dalam metode ini, pelat KLT yang telah digunakan untuk memisahkan senyawa dianalisis secara kuantitatif menggunakan kamera CCD (charge-coupled device) dan perangkat lunak khusus. Kamera menangkap gambar pelat secara keseluruhan, dan hasilnya diolah menjadi kromatogram yang merepresentasikan intensitas bercak senyawa pada pelat tersebut. Metode ini sangat cocok untuk menganalisis senyawa yang menunjukkan quenching fluoresensi di bawah sinar UV.

Proses kerja metode ini melibatkan beberapa tahap penting. Pertama, pelat KLT disinari secara merata dengan cahaya UV pada panjang gelombang 254 nm menggunakan lampu UV/VIS. Kamera CCD menangkap gambar bercak senyawa yang muncul pada pelat. Gambar ini kemudian diolah menggunakan perangkat lunak seperti Camag Video Scan untuk menghasilkan profil kromatogram. Hasilnya

berupa grafik yang menunjukkan intensitas bercak sebagai fungsi dari posisi bercak pada pelat, yang selanjutnya dapat digunakan untuk kuantifikasi senyawa.

Pengaturan instrumen sangat mempengaruhi kualitas hasil analisis. Beberapa parameter kunci yang harus diperhatikan meliputi aperture (f-stop), jumlah frame yang dikumpulkan, dan waktu eksposur. Pengaturan aperture yang optimal sangat penting karena aperture yang terlalu besar menghasilkan gambar yang terlalu terang, sedangkan aperture yang terlalu kecil menghasilkan gambar yang gelap. Jumlah frame yang dikumpulkan juga mempengaruhi kecerahan gambar. Semakin banyak frame, semakin terang gambar yang dihasilkan, tetapi pengumpulan frame yang berlebihan dapat meningkatkan kebisingan dasar (baseline noise). Oleh karena itu, pengaturan yang seimbang diperlukan untuk mendapatkan gambar dengan pencahayaan moderat yang optimal untuk analisis.

Beberapa parameter kinerja, seperti sensitivitas, batas deteksi (LOD), dan presisi, bergantung pada pengaturan ini. Sensitivitas analisis maksimum biasanya tercapai dengan kombinasi aperture dan jumlah frame tertentu. Misalnya, pada pelat HPTLC RP-18, sensitivitas tertinggi ditemukan pada pengaturan aperture $f = 5.6$ dengan 4 frame. Namun, sensitivitas tinggi tidak selalu menjamin batas deteksi yang rendah, karena kebisingan dasar yang tinggi pada pengaturan tertentu dapat mempengaruhi keakuratan hasil. Presisi, yang diukur sebagai simpangan baku relatif (RSD), lebih baik pada gambar dengan pencahayaan moderat. Dalam penelitian ini, RSD berada di bawah 2% untuk pengaturan yang optimal (Petrovic, 2000).

Beberapa perangkat lunak seperti ImageJ, Sorbfil TLC, Just-TLC, dan TLC Analyzer telah banyak digunakan untuk mengonversi hasil visualisasi menjadi profil kromatogram. Perangkat lunak ini membantu dalam identifikasi dan kuantifikasi senyawa berdasarkan intensitas warna atau nilai absorbansi UV.

Software yang dipakai dalam analisis ini adalah ImageJ, sebuah sistem yang dirancang oleh National Institutes of Health (NIH) di Amerika Serikat. ImageJ terkenal karena mudah digunakan, sederhana, dan serbaguna, meskipun ada perangkat lunak lain yang juga dapat digunakan. Program ini mendukung berbagai

format gambar seperti JPEG dan TIFF. Dalam analisis pelat KLT, ImageJ dapat membantu mengolah gambar fluoresensi quenching atau deteksi warna. Proses pembalikan gambar dilakukan agar piksel analit memiliki nilai positif, sedangkan piksel latar belakang memiliki nilai lebih kecil, sehingga analisis menjadi lebih akurat. Selain itu, ImageJ secara otomatis dapat menyesuaikan perbedaan ukuran area pada gambar, sehingga memudahkan proses analisis data kromatografi (Popovic & Sherma, 2014).

2.6 Validasi Metode

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

2.6.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan untuk mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama untuk menentukan adanya komponen lain yang 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 cemaran, 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 selektivitas (α) dan resolusi dapat dicari dengan :

$$\text{Faktor selektivitas } (\alpha) = \frac{drA}{drB}$$

2.6. 2 Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004).

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 instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Sy). Dari data yang diperoleh, nilai koefisien korelasi (r) yang baik atau yang memenuhi persyaratan yaitu yang mendekati 1 (Harmita, 2004).

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

$$y' = a + bx$$

$$Sx0 = \frac{Sy}{b}$$

$$Vx0 = \frac{Sx0}{x}$$

Keterangan:

b = slope

a = intersep atau perpotongan sumbu y

2.6. 3 Sensitivitas (Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung dengan mengukur respon

blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku dan larutan blanko sampel, dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned} Sy/x &= \sqrt{\frac{\sum (y-y')^2}{n-2}} \\ BD &= \frac{3Sy/x}{b} \\ BD &= \frac{10Sy/x}{b} \end{aligned}$$

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

2.6. 4 Uji Perolehan Kembali (Akurasi dan Presisi)

Akurasi (kecermatan) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang 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).

Metode adisi (penambahan bahan baku) yaitu dengan cara 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 (Harmita, 2004).

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

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).

Standar Deviasi (SD)

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

Koefisien Variasi (KV)

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