

**PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN
KADAR BETAMETASON DAN DEKSKLORFENIRAMIN MALEAT PADA SEDIAAN
TABLET KOMBINASI**

Laporan Tugas Akhir

**Anggina Widya
11161126**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR BETAMETASON DAN DEKSKLORFENIRAMIN MALEAT PADA SEDIAAN TABLET KOMBINASI

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Anggina Widya
11161126

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(apt. Winasih Rachmawati, M.Si)



(Ivan Andriansyah, M.Pd)

ABSTRAK

PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR BETAMETASON DAN DEKSKLORFENIRAMIN MALEAT PADA SEDIAAN TABLET KOMBINASI

Oleh :

Anggina Widya

11161126

Sediaan farmasi yang beredar di perdagangan seringkali berbentuk kombinasi campuran berbagai zat berkhasiat. Kombinasi zat aktif yang sering digunakan adalah betametason dan deksklorfeniramin maleat, kedua zat aktif tersebut mempunyai efek anti inflamasi dan anti alergi. Obat ini perlu diimbangi dengan peningkatan pengawasan mutu, agar obat yang beredar dapat terjamin keamanan dan khasiatnya. Maka perlu dilakukan metode analisis yang sederhana yaitu metode KLT Video densitometri. Tujuan dari penelitian ini memvalidasi metode KLT video densitometri dalam penetapan kadar sediaan tablet kombinasi betametason dan deksklorfeniramin maleat. Tahapan penelitian meliputi uji selektivitas menggunakan plat KLT GF₂₅₄ dengan menggunakan fase gerak etanol:ammonia (14:1v/v); validasi metode, dan penetapan kadar dalam sediaan tablet. Visualisasi dan perekaman bercak menggunakan seperangkat alat video densitometri dan pengukuran luas dibawah kurva (AUC) dari gambar bercak menggunakan *software* ImageJ. Hasil uji selektivitas diperoleh nilai Rf betametason dan deksklorfeniramin maleat berturut-turut adalah 0,8 dan 0,28. Persamaan kurva kalibrasi untuk betametason dan deksklorfeniramin maleat secara berturut-turut $y = 27,582x + 14403$ dan $y = 33,722x + 35431$. Diperoleh hasil penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat untuk sampel 1 sebesar 98,2959% dan 101,7796%. Untuk sampel 2 sebesar 98,3490% dan 101,5494%. Nilai-nilai parameter validasi tersebut memenuhi syarat yang telah ditetapkan sehingga metode KLT video densitometri dapat digunakan untuk penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat.

Kata Kunci : Betametason, Deksklorfeniramin maleat, KLT Video densitometri.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TLC VIDEO DENSITOMETRY METHOD AS DETERMINATION OF BETAMETHASONE AND DEXCHLORPHENIRAMINE MALEATE LEVELS ON TABLET COMBINATION

By :

Anggina Widya

11161126

Pharmaceutical preparations circulating in the market often use the combination of various advantageous substances. The combination of active substances that are often used is betamethasone and dexchlorpheniramine maleate, both of which possess anti-inflammatory and anti-allergic effects. Adequate quality control of these drugs is needed to confirm their safety and efficacy. Therefore, it is essential to do accurate analysis and a simple method is by using KLT video densitometry. The purpose of this study is to validate the KLT video densitometry in determining levels of betamethasone and dexchlorfeniramine maleate combination tablets. Stages of research include selectivity testing using the KLT GF₂₅₄ plate and developed using mobile phase ethanol: ammonia (14:1v/v); method validation; and determination of levels on combination. Visualization and spotting recording analysis utilizing a set of video densitometric tools and measuring the area under curve (AUC) of the spotting images using ImageJ software. The results of the selectivity test showed that the R_f value of betamethasone and dexchlorpheniramine maleate were 0.8 and 0.28, respectively. Calibration curve equations for betamethasone and dexchlorpheniramine maleate are $y = 27.582x + 14403$ and $y = 33,722x + 35431$. The results indicate the determination levels betamethasone and dexchlorpheniramine maleate for samples 1 are 98,2959% and 101,7796%. Meanwhile, the values for sample 2 are 98,3490% and 101,5494%. The validation parameter values suffice the established requirements. This, KLT video densitometry is can to be applied in the determination of betamethasone and dexchlorpheniramine maleate levels.

Keyword : Betamethasone, Dexchlorpheniramine maleate, TLC Video densitometry

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran-Nya yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayah-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir yang berjudul “PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR BETAMETASON DAN DEKSKLORFENIRAMIN MALEAT PADA SEDIAAN TABLET KOMBINASI” sebagai salah satu persyaratan kelulusan Program Strata Satu di Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana Bandung.

Selama penyusunan Laporan Tugas Akhir ini, penulis telah banyak menerima dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu, penulis mengucapkan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Keluarga khususnya ayah Indra Surya, ibu Widi Hastuti, teteh aura, dan teteh aurina yang sangat penulis sayangi. Terimakasih selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil serta doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
2. Ibu apt. Winasih Rachmawati, M.Si. selaku pembimbing utama dan bapak Ivan Andriansyah, M.Pd. selaku pembimbing serta yang senantiasa memberikan pengarahan, meluangkan waktu bimbingan, nasihat, dan bantuan kepada penulis selama penelitian berlangsung.
3. Anisak meilinda sahabat yang selalu memberikan dukungan dan semangat.
4. Sahabat masa SMA Devi dan team Caleuy yang selalu memberikan dukungan dan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini
5. Bena Monita sebagai partner dari awal masuk perkuliahan sampai partner penelitian yang selalu memberikan semangat dan keyakinan dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
6. CIS Group (Sela, Sri, Pepe, dan Putrisyara) dan Wanda Rizki yang selalu memberikan dukungan dan terimakasih sudah selalu ada selama masa perkuliahan hingga tugas akhir ini selesai.
7. Kang Kurnia yang telah membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini
8. Teman-teman angkatan 2016 yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu karena telah memberikan semangat dan bantuan selama proses pembelajaran dikampus.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan tugas akhir ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun.

Harapan penulis semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca. Atas perhatiannya penulis ucapkan terima kasih.

Penulis, Agustus 2020

Anggina Widya

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	2
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1. Betametason	3
II.1.1. Sifat Fisikokimia	3
II.1.2. Mekanisme Kerja	3
II.1.3. Efek Samping	4
II.1.4. Penetapan kadar	4
II.2. Deksklorfeniramin Maleat	4
II.2.1. Sifat Fisikokimia	4
II.2.2. Mekanisme Kerja	5
II.2.3. Efek Samping	5
II.2.4. Penetapan Kadar	5
II.3. Kromatografi Lapis Tipis	6
II.3.1. Fase Diam	7
II.3.2. Fase Gerak	7
II.4. KLT Densitometri	8
II.5. KLT Videodensitometri	9
II.5.1. Prinsip KLT Videodensitometri	9
II.5.2. Peralatan KLT Videodensitometri	10
II.5.3. Software untuk Menganalisis Bercak	11
II.5.4. Keuntungan Videodensitometri	12
II.6. Validasi metode Analisis	12

II.6.1.	Selektivitas	12
II.6.2.	Linearitas	13
II.6.3.	Uji Sensitifitas	14
II.6.4.	Uji Perolehan Kembali	14
II.7.	Kondisi Optimum Pemisahan	15
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN		16
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN		17
IV.1.	Pembuatan Larutan Baku Betametason 1000 bpj	17
IV.1.1.	Pembuatan Larutan Baku Deksklorfeniramin Maleat 1000 bpj	17
IV.1.2.	Pembuatan Larutan Baku Campuran	17
IV.1.3.	Pembuatan Seri Larutan Baku Campuran.	17
IV.2.	Penyiapan Fase Diam	17
IV.2.1.	Optimasi sistem KLT	17
IV.3.	Analisa Kromatogram	18
IV.4.1.	Uji Selektifitas	18
IV.4.2.	Uji Linearitas dan Uji Sensitifitas	19
IV.4.3.2	Presisi	20
IV.5.	Penetapan Kadar Betametason dan Deksklorfeniramin Maleat dalam Sediaan Tablet	20
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN		22
V.1.	Pencarian Kondisi Optimum Pemisahan	22
V.2.	Pencarian Konsentrasi Terendah Betametason dan Deksklorfeniramin Maleat	24
V.3.	Visualisasi dan Perekaman Bercak	24
V.4.	Pengukuran Bercak Secara Densitometri	25
V.5.	Hasil Validasi Metode Analisis	26
V.6.	Selektivitas	26
V.6.2.	Sensitifitas	28
V.6.3.	Uji Perolehan Kembali	29
V.7.	Penetapan Kadar	31
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN		33
VI.1.	Kesimpulan	33
DAFTAR PUSTAKA		35
LAMPIRAN		37

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Sistem KLT yang digunakan dalam betametason dan Deksklorfeniramin Maleat.....	15
Tabel 4. 1 Komposisi Tablet Simulasi per Tablet.....	20
Tabel 5. 1 Kondisi pemisahan betametason dan deksklorfeniramin maleat dalam berbagai fase gerak.....	22
Tabel 5. 2 Data pencarian konsentrasi terendah.....	24
Tabel 5. 3 Data Uji Linearitas.....	27
Tabel 5. 4 Hasil Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	29
Tabel 5. 5 Hasil Perhitungan Akurasi untuk Sampel simulasi Betametason dan Deksklorfeniramin Maleat.....	30
Tabel 5. 6 Data Presisi Betametason dan Deksklorfeniramin maleat.....	30
Tabel 5. 7 Data penetapan kadar sampel.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur Kimia Betametason.....	3
Gambar 2. 2 Struktur Kimia Deksklorfeniramin Maleat.....	4
Gambar 2. 3 Pengembangan plat KLT.....	7
Gambar 5. 1 Kondisi optimum pemisahan campuran betametason dan dekslorfeniramin maleat.....	23
Gambar 5. 2 Rangkaian peralatan KLT Video densitometri.....	25
Gambar 5. 3 Analisis pengukuran densitas bercak menggunakan ImageJ.....	25
Gambar 5. 4 Plot konsentrasi betametason terhadap AUC.....	27
Gambar 5. 5 Plot konsentrasi dekslorfeniramin maleat terhadap AUC.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. sertifikat COA Betametason.....	37
Lampiran 2. sertifikat COA Deksklorfeniramin maleat.....	38
Lampiran 3. Uji Selektifitas.....	39
Lampiran 4. Kurva Kalibrasi.....	40
Lampiran 5. Hasil Akurasi.....	43
Lampiran 6. Hasil Presisi.....	45
Lampiran 7. Penetapan Kadar.....	47

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	MAKNA
BTS	Betametason
DCTM	Deksklorfeniramin Maleat
KLT	Kromatografi Lapis Tipis

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Obat digunakan sebagai pendukung di dalam dunia kesehatan. Obat adalah suatu bahan yang dimaksudkan untuk digunakan dalam menetapkan diagnosa, mencegah, mengurangi, menghilangkan, menyembuhkan penyakit atau gejala penyakit, luka atau kelainan badaniah dan rohaniah pada manusia atau hewan, memperelok badan atau bagian badan manusia (Anief, 2006). Sediaan obat terdapat lebih dari satu komponen zat aktif. Kombinasi zat aktif yang sering digunakan adalah betametason dan deksklorfeniramin maleat yang tersedia dalam bentuk sediaan tablet dengan berbagai merek dagang di pasaran. Betametason mempunyai efek anti inflamasi atau anti peradangan. Deksklorfeniramin mempunyai efek anti histamin, sebagai obat anti alergi dan gatal (Suherman and Ascobat, 2007).

Dosis penggunaan Betametason dan Deksklorfeniramin maleat kecil karena jika berlebihan dampaknya akan terjadi gangguan musculoskeletal dan perforasi sehingga membutuhkan metode analisis yang tepat untuk menentukan kadar masing-masing obat. Pengujian yang dapat digunakan yaitu pengukuran analitik yang meliputi pengukuran dan penetapan kadar obat.

Penelitian tentang penetapan kadar campuran betametason dan deksklorfeniramin maleat dalam sediaan tablet dengan metode spektrofotometri dan KCKT menggunakan kolom Shimpack LC-10AT VP fase diam C18 dan fase gerak air:metanol (45:55, v/v) pada panjang gelombang 240 nm dengan laju alir 1 ml (Mustarichie, R., Musfiroh, I., dan Levita, 2014). Penelitian ini membutuhkan waktu yang lama sehingga diperlukan perbandingan fase gerak yang lebih optimal.

(Rivai et al., 2017) telah melakukan uji validasi untuk analisis tablet betametason menggunakan spektrofotometri ultraviolet selanjutnya untuk penetapan kadar menggunakan metode luas daerah dibawah kurva atau area under curve (AUC). Dengan metode absorbansi dan luas daerah di bawah kurva. Kedua metode tersebut adalah metode yang valid untuk menganalisis betametason tablet. Sehingga didapatkan pelarut terbaik yang digunakan untuk analisis betametason dengan metode spektrofotometri ultraviolet adalah asam hidroklorida 0,1 N.

Pada penelitian yang sudah terpublikasi telah dilakukan analisis kadar campuran betametason dan deksklorfeniramin maleat secara simultan menggunakan metode

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Sedangkan untuk analisis kadar campuran obat dengan metode KLT Video Densitometri belum memiliki metode penetapan kadar yang terpublikasi. Oleh karena itu, peneliti akan melakukan pengembangan suatu metode KLT Video densitometri untuk melakukan penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat secara simultan. Adapun alasan untuk memilih metode KLT Videodensitometri ini karena metode ini memiliki beberapa kelebihan yaitu spesifisitas yang tinggi, dapat dipercaya, pengerjaan relatif cepat, biaya pengoperasian relatif murah, polaritas pelarut atau pelarut campuran dapat diubah dalam waktu singkat dan jumlah pelarut yang digunakan sedikit. Parameter validasi yang diuji meliputi akurasi, presisi, batas deteksi, dan batas kuantitasi. KLT Video densitometri adalah metode analisis kualitatif dan kuantitatif yang berdasarkan analisis gambar (Saragih, 2015).

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dibuat perumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pemisahan kromatografi fase gerak yang dapat menentukan kadar betametason dalam tablet kombinasi dengan deksklorfeniramin maleat menggunakan metode KLT Videodensitometri.
2. Apakah penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat memenuhi persyaratan uji validasi.
3. Apakah penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat dalam sediaan tablet dapat ditetapkan dengan metode KLT Videodensitometri.

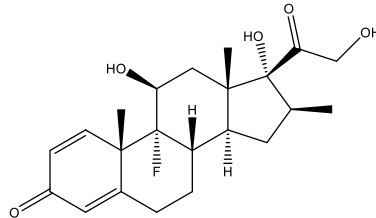
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

2. Menganalisis sistem pemisahan kromatografi fase gerak pada penetapan kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat pada sediaan tablet kombinasi.
3. Menganalisis hasil uji validasi metode KLT Videodensitometri pada penetapan kadar campuran betametason dan deksklorfeniramin maleat dalam sediaan tablet kombinasi.
4. Menganalisis kadar betametason dan deksklorfeniramin maleat dalam sediaan tablet kombinasi yang dianalisis menggunakan metode KLT Videodensitometri.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Betametason

II.1.1. Sifat Fisikokimia



Gambar 2. 4 Struktur Kimia Betametason

Nama kimia	: 9-Fluoro-11 β ,17,21-trihydroxy-16 β -methylpregna-1,4-diene- 3,20-dione
Rumus Molekul	: C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
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 and 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.

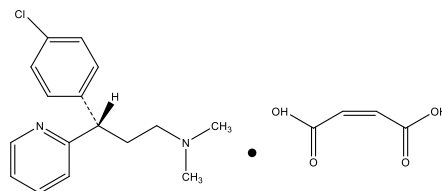
Menggunakan obat kortikosteroid dengan dosis tinggi dapat menyebabkan *syndrom Chusing* dengan berbagai gejala sebagai berikut: *moon face*, *striaedan* *acne* yang dapat pulih (reversibel) bila terapi dihentikan, tetapi cara menghentikan terapi harus dengan menurunkan dosis secara bertahap untuk menghindari 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 μ 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 2. 5 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 di otot licin dinding pembuluh dan dengan demikian menghindarkan timbulnya reaksi alergi. Khasiat lainnya menciutkan 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 epigastrium, 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

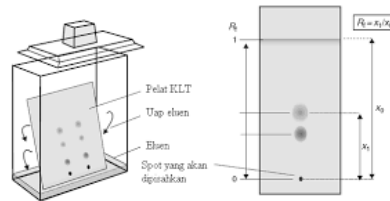
Prinsip dari kromatografi lapis tipis yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fase diam dari bentuk plat silica dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

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 melarutkan solut. Fase diam pada KLT dapat berupa silika gel, dan selulosa. Terdapat beberapa jenis silika gel berdasarkan komponen pengikatnya seperti silika gel G, silika gel F, dan silika gel H. Untuk penyangga dari fase diam dapat berupa kaca, plastik, atau aluminium. 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 dari 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 melarut 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 menggantikan 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 2. 6 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 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata fase diam dan semakin sempit ukuran fase diam maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi 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, benzena, 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 R_f 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 R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter kedalam pelarut non polar seperti metal benzena akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.

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 flour 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 berfluoresensi analit atau hasil reaksi analit.

Keunggulan adalah dititikberatkan untuk analisis analit-analit dengan kadar sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahakan 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 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).

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 intensitas.
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 aluminium 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 GF₂₅₄ 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 μ 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* 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 selektivitas (α) dan resolusi dapat dicari dengan:

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

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

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

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 Kuantitasi merupakan konsentrasi terendah analit didalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang daapat 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. Uji Perolehan Kembali

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.

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

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 2. 2 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 and Pyka, 2014)	Betametason	Kloroform-metanol-asam asetat (99,5%) (28:5:0,5)	0,71
(DołowY and Pyka, 2014)	Betametason	Kloroform-Metanol-Air (45: 11: 1)	0,69