

**PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN
KADAR PSEUDOEFDRIIN HCI DAN TRIPROLIDIN HCI PADA SEDIAAN TABLET**

Laporan Tugas Akhir

**Bena Monita Ryjki
11161130**



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

LEMBAR PENGESAHAN

PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR PSEUDOEFDRIIN HCI DAN TRIPROLIDIN HCI PADA SEDIAAN TABLET

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Bena Monita Ryjki
11161130

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(apt. Winasih Rachmawati, M.Si)



(Emma Emmawati, M.Si)

ABSTRAK

PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR PSEUDOEFEDRIN HCl DAN TRIPROLIDIN HCl PADA SEDIAAN TABLET

Oleh :

**Bena Monita Ryjki
11161130**

Obat flu merupakan formulasi yang paling banyak beredar di pasaran. Salah satu sediaan obat batuk yang beredar yaitu pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl. Agar suatu obat dapat terjamin keamanannya perlu dilakukan analisis metode, salah satu metode yang sederhana adalah KLT video densitometri. Tujuan dari penelitian ini untuk memvalidasi metode dalam menetapkan kadar pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl pada sediaan tablet menggunakan metode KLT video densitometri. Tahapan penelitian pencarian kondisi optimum sistem KLT menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak kloroform : aquadest : metanol : ammonia (38:5:1:6 v/v/v/v), validasi metode analisis, dan penetapan kadar. Perekaman gambar di bawah lampu UV 254 nm menggunakan alat video densitometri dan pengukuran luas dibawah kurva (AUC) dari gambar bercak menggunakan perangkat lunak ImageJ. Penotolan sampel dilakukan secara manual menggunakan mikrosiring. Hasil uji selektivitas diperoleh nilai Rf pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl adalah 0,34 dan 0,7. Persamaan kurva kalibrasi untuk pseudoefedrin HCl $Y = 4,4085x + 13,454$ dan pada triprolidin HCl $Y = 51,576x + 8767,2$. Hasil penetapan kadar pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl pada sediaan tablet pada sampel 1 sebesar 100,5% dan 100,6%, pada sampel 2 sebesar 100,6% dan 100,8% dan telah memenuhi syarat yang ditetapkan dalam United State Pharmacopeia. Berdasarkan nilai-nilai parameter validasi dan hasil penetapan kadar tersebut maka metode KLT video densitometri memenuhi syarat yang telah ditetapkan untuk analisis kadar campuran pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl.

Kata Kunci : KLT video densitometri, pseudoefedrin HCl, triprolidin HCl, validasi metode.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TLC VIDEO DENSITOMETRY METHOD AS A DETERMINATION OF PSEUDOEPHEDRINE HCl AND TRIPROLIDINE HCl LEVELS ON TABLET PREPARATIONS

By :

Bena Monita Ryjki

11161130

Cold medicines are among the highest formulated drugs distributed on the market. The most common cough and cold medicine is pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl. Method analysis is essential to guarantee drug safety, one of the simplest methods is TLC video densitometry. The purpose of this study was to validate the method in determining the levels of pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl in tablet preparations using the TLC video densitometry. Stages of the research are finding the optimum condition of the TLC system using silica gel GF₂₅₄ plate with a mobile phase chloroform: aquadest: methanol: ammonia (38:5:1:6 v/v/v/v); validation of analytical methods; and determination of content. Image recording under a 254 nm UV lamp using a densitometric video tool and measurement of the area under the curve (AUC) of the spotting image using ImageJ software. Sampling is done manually using microsiring. The selectivity test results obtained R_f pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl values are 0.34 and 0.7,. Calibration curve equation for pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl are $Y = 4,4085x + 13.454$ and for $Y = 51.576x + 8767.2$. The results of determining the levels of pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl in tablet preparations in sample 1 are 100.5% and 100.6%, in sample 2 are 100.6% and 100.8%. These results had fulfilled the requirements stipulated in United State Pharmacopeia. Based on the values of the validation parameters and the results of the determination of the levels, the Densitometry video TLC method fulfills the requirements set for the analysis of levels of a mixture of pseudoephedrine HCl and triprolidine HCl.

Keywords: TLC video densitometry, pseudoephedrine HCl, triprolidin HCl, validation of methods.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT pencipta seluruh alam semesta karena atas berkah, rahmat dan karunianya yang senantiasa dilimpahkan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan baik dengan judul "PENGEMBANGAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI SEBAGAI PENETAPAN KADAR PSEUDOEFEDRIN HCl DAN TRIPROLIDIN HCl PADA SEDIAAN TABLET DI PASARAN" sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana.

Penulis juga menyadari bahwa selama berlangsungnya penyusunan skripsi ini tak lepas dari dukungan serta bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu serta mendukung dalam penyusunan skripsi ini terutama kepada :

1. Kedua Orang Tua, mamah, bapak, kakak-kakak tercinta Deckin, Fachri, Ditha dan adik tersayang Azwar yang selalu memberikan doa , semangat dan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan baik.
2. Ibu apt. Winasih Rachmawati M.Si selaku pembimbing utama dan Ibu Emma Emmawati M.Si selaku pembimbing serta yang telah memberikan ilmu dan masukan selama proses penelitian serta penyusunan skripsi secara keseluruhan.
3. Randi Antami Zudata Putra yang sudah menemani, memberikan dukungan dan semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
4. *CIS Gengs* (Anggina, Sela, Sri, Putri Syara, dan Putri Permata) yang telah memberikan dukungan, motivasi, dan menjadi tempat berkeluh kesah serta teman kuliner selama 4 tahun ini.
5. Firda Hasna selaku *tablemate* semasa SMA yang setia hingga saat ini untuk selalu memberikan semangat, motivasi dan mendengarkan segala curahan hati.
6. Teman-teman FA3 yang telah menemani masa-masa kuliah selama 4 tahun ini.
7. Teman-teman angkatan 2016 yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu karena telah memberikan semangat dan bantuan selama proses pembelajaran di kampus.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dikarenakan terbatasnya pengalaman dan pengetahuan yang dimiliki penulis. Oleh karena itu, penulis mengharapkan segala bentuk saran serta masukan bahkan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan semua pihak.

Penulis, Agustus 2020

Bena Monita Ryjki

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	2
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian	2
1.4. Tempat dan waktu penelitian.....	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1. Pseudoefedrin HCl.....	3
II.2 Triprolidin HCl.....	4
II.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	5
II.3.1 Prinsip KLT	5
II.3.2 Fase Diam.....	5
II.3.3 Fase Gerak.....	6
II.4 KLT Video densitometri	7
II.4.1 Bagian-bagian KLT Video densitometri.....	7
II.5 Software ImageJ	9
II.6 Validasi Metode Analisis	9
II.7 Sistem KLT yang Digunakan pada Pseudoefedrin HCl dan Triprolidin HCl	13

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	14
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	15
IV.1 Penyiapan Larutan Baku	15
IV.1.1 Pembuatan Larutan Baku Triprolidin HCl.....	15
IV.1.2 Pembuatan Larutan Baku Pseudoefedrin HCl.....	15
IV.1.3 Pembuatan Seri Larutan Baku Campuran.....	15
IV.2 Penyiapan Fase Diam	16
IV.3 Optimasi Sistem KLT	16
IV.4 Analisa Kromatogram.....	16
IV.5 Validasi Metode Analisis	16
IV.5.1 Uji Selektivitas	17
IV.5.2 Uji Linearitas, Batas Deteksi, dan Batas Kuantitasi.....	17
IV.5.3 Uji Perolehan Kembali	18
IV.6 Penetapan Kadar Sampel	19
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
V.1 Pencarian kondisi optimum sistem KLT	20
V.2 Pencarian Konsentrasi terendah Pseudoefedrin HCl dan Triprolidin HCl	22
V.3 Visualisasi dan Perekaman Bercak	22
V.4 Hasil Validasi Metode Analisis	24
V.5 Penetapan Kadar Sampel.....	29
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	32
VI.1 Kesimpulan	32
VI.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

Tabel II. 1 Sistem KLT yang digunakan dalam Pseudoefedrin HCl dan Triprolidin HCl	13
Tabel IV. 1 Komposisi Tablet Simulasi per Tablet	18
Tabel V. 1 Kondisi pemisahan pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl dalam berbagai komposisi fase gerak.....	20
Tabel V. 2 Data pencarian konsentrasi terendah	22
Tabel V. 3 Data uji linearitas.....	25
Tabel V. 4 Hasil batas deteksi dan batas kuantitasi pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl.....	27
Tabel V. 5 Hasil perhitungan akurasi untuk sampel simulasi pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl	28
Tabel V. 6 Data presisi pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl	29
Tabel V. 7 Data penetapan Kadar sampel 1	30
Tabel V. 8 Data penetapan Kadar sampel 2	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar II. 1 Struktur kimia Pseudoefedrin HCl.....	3
Gambar II. 2 Struktur kimia triprolidine HCl.....	4
Gambar V. 1 Kondisi optimum pemisahan campuran Pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl.....	21
Gambar V. 2 Rangkaian alat KLT video densitometri. Software ImageJ (1), Kotak lampu (2), UV filter (3), Kamera (4), dan Gorila pod (5).	23
Gambar V. 3 Pengukuran densitas bercak menggunakan software ImageJ: (1) toolbar ImageJ, (2) Plat KLT dan setting pemindaian, dan (3) kurva konversi bercak.....	24
Gambar V. 4 Plot konsentrasi triprolidin HCl terhadap AUC.....	26
Gambar V. 5 Plot konsentrasi pseudoefedrin HCl terhadap AUC	26
Gambar V. 6 Pengukuran densitas bercak untuk uji akurasi.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sertifikat COA pseudoefedrin HCl	36
Lampiran 2 Sertifikat COA triprolidin HCl	37
Lampiran 3 Uji Selektivitas	38
Lampiran 4 Kurva Kalibrasi Triprolidin HCl.....	39
Lampiran 5 Kurva Kalibrasi Pseudoefedrin HCl.....	40
Lampiran 6 Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi triprolidin HCl	41
Lampiran 7 Hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi pseudoefedri HCl	42
Lampiran 8 Hasil uji akurasi triprolidin HCl	43
Lampiran 9 Hasil uji akurasi pseudoefedrin HCl	44
Lampiran 10 Hasil uji presisi triprolidin HCl.....	45
Lampiran 11 Hasil uji presisi pseudoefedrin HCl	46
Lampiran 12 Perhitungan kadar triprolidin HCl.....	47
Lampiran 13 Hasil perhitungan kadar pseudoefedrin HCl.....	48

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	MAKNA
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
GF	Gypsum Fluorosensi
KV	Koefisien Variasi
BD	Batas Beteksi
BK	Batas Kuantitasi
SD	Standar Deviasi
BPJ	Bagian Per Juta
NM	Nano Meter
UV	Ultraviolet

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Obat flu merupakan formulasi yang paling banyak beredar dalam bentuk kombinasi zat dari beberapa bahan aktif yang masing-masing bertujuan untuk mengurangi berbagai gejala flu yang bervariasi. Penggunaan obat dikatakan rasional antara lain jika pilihan obat tepat sesuai indikasinya. Pemilihan obat flu yang rasional dipilih dengan kandungan bahan aktif yang sesuai untuk gejala yang dialami. Salah satu sediaan obat flu yang mengandung lebih dari satu macam zat aktif adalah triprolidin HCl dan pseudoefedrin HCl.

Penetapan kadar perlu dilakukan untuk memastikan apakah kadar dari suatu zat tidak melebihi dari yang telah ditetapkan. Karena terdiri lebih dari satu komponen zat, maka untuk menetapkan kadarnya perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu. Senyawa yang terdapat pada kromatografi dipisahkan berdasarkan perbedaan pada kecepatan migrasi hal ini ditandai dengan adanya perbedaan koefisien distribusi dari masing-masing senyawa di antara dua fase yang bersinggungan dan tidak saling bercampur, yang disebut sebagai fase gerak yang berupa zat cair atau gas dan fase diam yang berupa zat cair atau zat padat (Noegrohati, 1994)

Dalam penelitian yang telah dilakukan (Sriphong, Chaidedgumjorn, & Chaisuroj, 2009), penetapan kadar pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl dilakukan dengan menggunakan metode Spektrofotometri Derivat. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Hinge, Patel, & Mahida, 2015) penetapan kadar pada pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan mencampur metanol dan air sebagai fase gerak dengan perbandingan 80:20 v/v dan pH 3.0 yang disesuaikan dengan asam fosfat ortho.

Metode KLT video densitometri, dapat dikembangkan sebagai metode alternatif dari metode KCKT dan menjadi alternatif bagi keterbatasan pada spektrofotometri UV. KLT sendiri cocok untuk analisis obat dilaboratorium farmasi, karena metodenya sederhana, cepat dalam pemisahan, kecepatan pemisahan tinggi, dan memerlukan jumlah cuplikan yang sangat sedikit (Khopkar, 1990).

Pada penelitian kali ini, peneliti menggunakan metode KLT video densitometri. Dimana penetapan kadar pada metode ini dapat dikatakan cukup ekonomis, hal ini

dikarenakan pada KLT video densitometri menggunakan fase gerak yang sedikit, waktu yang relatif singkat dan juga dapat dilakukan penetapan kadar beberapa sampel secara simultan. Prinsip penentuan dengan metode KLT video densitometri hampir sama dengan metode spektrofotometri, dimana kadar analit dikorelasikan dengan luas noda pada plat KLT yang diukur pada posisi diam. Selain itu, penetapan kadar pada sediaan tablet pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl belum banyak dilakukan menggunakan metode KLT video densitometri. Oleh sebab itu peneliti memilih metode KLT video densitometri.

1.2. Rumusan masalah

1. Bagaimana sistem pemisahan kromatografi pada penetapan kadar pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl dalam tablet menggunakan metode KLT video densitometri.
2. Apakah penetapan kadar pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl dalam tablet memenuhi persyaratan uji validasi.
3. Apakah kadar pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl dalam sediaan tablet dapat ditetapkan dengan metode KLT video densitometri.

1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

1. Mengetahui sistem pemisahan kromatografi dalam penetapan kadar dari pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl.
2. Mengetahui hasil uji validasi terhadap metode KLT video densitometri pada penetapan kadar campuran dari pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl dalam sediaan tablet yang beredar di pasaran.
3. Mengetahui kadar dari pseudoefedrin HCl dengan triprolidin HCl dalam tablet yang beredar dipasaran yang di analisis dengan menggunakan metode KLT video densitometri.

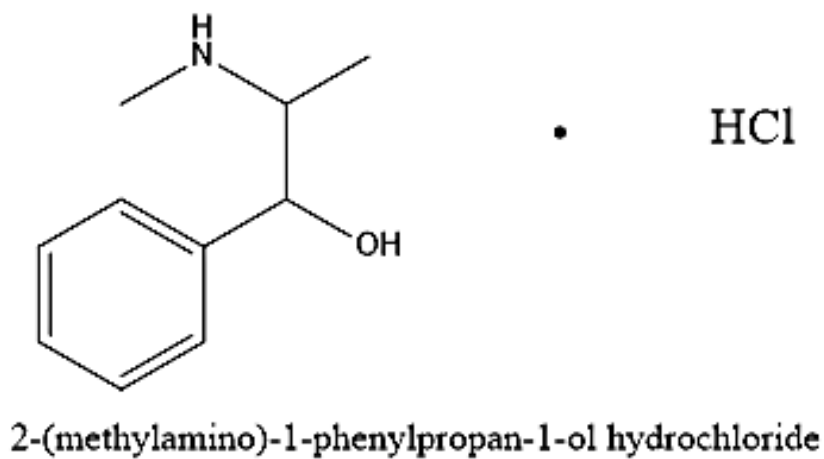
1.4. Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat penelitian dilakukan di Universitas Bhakti Kencana Bandung
2. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai bulan April

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Pseudoefedrin HCl

Pseudoefedrin HCl adalah salah satu obat simpatomimetik yang bekerja dengan cara langsung terhadap reseptor di otot polos dan jantung dan juga secara tak langsung dapat membebaskan noradrenalin. Penggunaan pseudoefedrin HCl yaitu bronkodilatasi kuat (β_2), dimana pseudoefedrin sebagai dekonjestan. Waktu paruh plasmanya adalah lebih kurang 7 jam. Pseudoefedrin HCl banyak digunakan dalam sediaan kombinasi untuk obat flu. Volume distribusi 3L/Kg. Dosis 3-4 kali sehari 60 mg (Tjay & Raharja, 2007)



Gambar II. 1 Struktur kimia Pseudoefedrin HCl

Pseudoefedrin hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_6H_{15}NO \cdot HCl$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

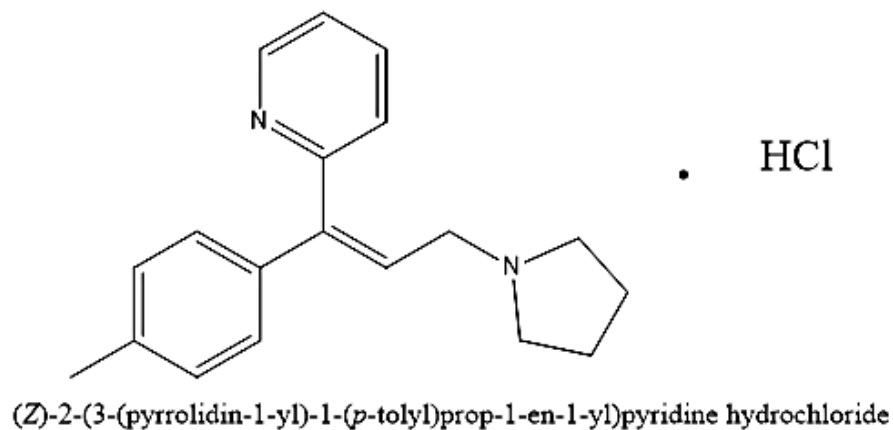
Berat Molekul : 201,70

Pemerian : Hablur putih atau serbuk putih, serbuk halus putih atau hampir putih, bau khas lemah.

Kelarutan : Sangat mudah larut dalam air, mudah larut dalam etanol, agak sukar larut dalam kloroform (Moffat, Osselton, & Widdop, 2011).

II.2 Triprolidin HCl

Triprolidin HCl adalah antihistamin yang bekerja dengan daya kuat. Mekanisme kerja dari triprolidin HCl yaitu dengan cara menghambat reseptor histamin dimana berfungsi untuk mengurangi efek histamin terhadap tubuh yang bekerja cepat dan bertahan lama. Dosis 1-10 mg dan diberikan pada malam hari berhubung dengan efek sedatifnya (Tjay & Raharja, 2007). Waktu paruhnya 1,5 sampai 20 jam, tetapi rata-rata 5 jam (Moffat et al., 2011).



Gambar II. 2 Struktur kimia triprolidine HCl

Triprolidin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0% $C_{29}H_{22}N_2 \cdot HCl$, dihitung terhadap zat anhidrat.

Berat Molekul : 332,87

Berat Molekul anhidrat : 314,86

Pemerian : Serbuk hablur putih, ringan, berbau tidak enak. Larutan bersifat basa terhadap lakmus, melebur pada suhu lebih kurang 115° .

Kelarutan : Larut dalam air, dalam etanol dan dalam kloroform, tidak larut dalam eter (Moffat et al., 2011).

II.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu jenis dari teknik pemisahan kromatografi. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, dapat dicapai pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat (Lesty, 2011).

Pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium, atau plat plastik. Fase gerak pada KLT dikenal juga sebagai pelarut pembanding, dimana fase gerak ini akan bergerak sepanjang fase diam. Hal ini dipengaruhi oleh kapiler pada pengembangan secara mekanik (*ascending*) atau dapat dipengaruhi juga oleh gravitasi yang terdapat pada pengembangan secara menurun (*descending*). Dalam pelaksanaannya, kromatografi lapis tipis ini lebih mudah dan lebih murah, demikian juga peralatan yang digunakan lebih sederhana (Rohman & Ganjar, 2007).

II.3.1 Prinsip KLT

Prinsip kerja dari KLT sendiri yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Pada teknik ini menggunakan fase diam berupa plat silika, fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang akan dipisahkan dan larutan campuran yang digunakan (eluen). Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen, maka akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Bower, 1992).

Selama pemisahan dalam sistem kromatografi, terjadi proses sorpsi dan desorpsi. Dimana sorpsi merupakan proses pemindahan solut dari fase gerak ke fase diam, sementara desorpsi merupakan proses pemindahan solut dari fase diam ke fase gerak. Ada empat jenis mekanisme sorpsi dasar dan umumnya dua atau lebih mekanisme ini terlibat dalam satu jenis kromatografi. Keempat jenis mekanisme tersebut yaitu, adsorpsi, partisi, pertukaran ion, dan eksklusi ukuran. Pada kromatografi lapis tipis, mekanisme yang terjadi yaitu adsorpsi (Rohman & Ganjar, 2007).

II.3.2 Fase Diam

Fase diam pada KLT yang digunakan berupa penyerap yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel dan semakin sempit kisaran ukuran pada fase diam, maka akan semakin baik kinerja dari KLT dalam

hal efisiensi dan resolusinya. Penyerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sementara sorpsi yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorpsi (Adamovics JA, 1997).

Sejauh ini, silika gel merupakan fase diam dari KLT yang paling penting dimana pembuatannya menggunakan presipitasi asam dari larutan natrium silika (Na_2SiO_3). Karakteristik sorpsi dari silika gel yaitu terletak pada permukaan gugus silanol (SiOH) yang mana bersifat asam lemah. Silika gel dapat mengikat tiga lapisan molekul air, dimana 2 lapisan atas dapat dihilangkan secara *reversible* dengan pemisahan 110°C , sedangkan pada suhu diatas 200°C air dapat hilang secara *irreversible*, dan ketika dipanaskan lebih dari 1000°C akan menghilangkan aktivitas, karena gugus silanol menghilang. Untuk itu, pemanasan pada silika gel tidak lebih dari 180°C (Spangenberg, Poole, & Weins, 2011).

II.3.3 Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, namun lebih sering dengan cara orientasi pengembang waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran dari dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Menurut (Steehler, 2003), ada beberapa petunjuk untuk memilih dan mengoptimasi fase gerak, diantaranya yaitu :

1. KLT termasuk teknik yang sensitif, sehingga pada fase geraknya harus mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi.
2. Daya elusi dari fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
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 .
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 atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat asam dan basa.

II.4 KLT Video densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental berdasarkan pada interaksi elektromagnetik dengan bercak pada plat KLT. Bercak pada plat KLT, sering juga disebut dengan analit. Densitometri biasanya digunakan untuk analisis kuantitatif, dimana kadar dari analit-analitnya kecil. Melakukan analisis kuantitatif dengan metode densitometri, perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu menggunakan KLT (Rohman & Ganjar, 2009)

Video densitometri adalah metode yang mempunyai prinsip kerja dengan pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik. Daya tarik utama untuk video densitometri untuk deteksi dalam kromatografi lapis tipis adalah akuisisi data cepat dan simultan. Keuntungan dari metode video densitometri dalam KLT yaitu dapat menghasilkan akuisisi data dengan cepat dan simultan, desain instrumen sederhana, terjadi peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data (Phattanawasin, Sotanaphun, & Sriphong, 2009).

Dalam KLT video densitometri yang perlu didapatkan yaitu densitas atau kerapatan dari bercak terhadap jarak vibrasi. Untuk mendapatkan densitas atau kerapatannya, kromatogram yang didapat perlu di-*invert* terlebih dahulu sehingga puncak-puncak yang diperoleh adalah densitas dari tiap bercak, dimana semakin tinggi densitas dari bercak tersebut, maka semakin tinggi pula puncak yang diperoleh (Zein Muttaqin, Aida, & Asnawi, 2018).

II.4.1 Bagian-bagian KLT Video densitometri

Menurut (Abou-Donia, Darwish, Toaima, Shawky, & Takla, 2014), peralatan KLT video densitometri diantaranya yaitu :

1. Plat KLT

Plat yang digunakan berupa silika gel. Silika gel perlu ditambah gips berupa kalsium fosfat untuk memperkuat pelapisannya pada pendukung. Sebagai pendukung, biasanya lapisan tipis digunakan dengan kaca yang berukuran 20x20 cm, 10x20 cm, atau 5x10 cm. Pendukung yang lain berupa lembaran aluminium atau plastik yang umumnya dibuat oleh pabrik dengan ukuran seperti yang telah dijelaskan diatas. Terkadang, silika gel ditambah senyawa fluoresensi, agar apabila disinari dengan sinar UV dapat berfluoresensi (berpendar). Contohnya yaitu silika gel GF₂₅₄ dimana artinya silika gel berpendar pada panjang gelombang 254 nm.

2. *Microcaps*

Microcaps dipilih karena memiliki harga yang murah dan sekali pakai namun memiliki kemampuan yang sangat baik dalam pembagian presisi. *Microcaps* yang digunakan memiliki tingkat kesalahan $\pm 1\%$, namun kesalahan hanya berlaku apabila pengisian dan pengosongan sampel pada *microcaps* dilakukan dengan benar. Ketika menotolkan sampel pada plat *microcaps*, harus benar-benar sampai kosong. Bercak sampel harus dipastikan benar-benar kosong sebelum plat dimasukkan ke dalam *chamber*. Data yang baik akan diperoleh ketika analit yang ditotolkan dilarutkan dalam pelarut yang kepolarannya lebih rendah dari fase gerak KLT dan ketika diperoleh spot yang melingkar.

3. Kamera Digital

Setelah plat di visualisasikan dibawah sinar UV, kemudian plat difoto dengan menggunakan kamera digital. Foto-foto tersebut diambil dibawah sinar 254 nm dan 366 nm dengan pencahayaan dari lampu ultraviolet. Harus diperhatikan bahwa untuk menghasilkan kuantifikasi yang baik, plat KLT pada saat foto tidak memerlukan pencahayaan yang terlalu banyak. Pengaturan terbaik untuk kamera dan plat yang akan difoto ditentukan oleh kontras dan cahaya pada kamera tersebut. Perbesaran pada kamera berfungsi untuk memastikan bahwa gambar dari plat KLT sudah 80% eluen yang menarik senyawa dan mengisi sekitar 80% plat KLT.

4. Linearitas Data

Untuk mendapatkan kadar dapat dihitung dari kurva yang didapatkan dari beberapa data pada setiap zat aktif dengan menggunakan ImageJ. Adanya penyerapan cahaya oleh analit pada plat KLT ini mengikuti hukum Lambert-Beer, data yang didapatkan membutuhkan metode matematika untuk menghasilkan kurva standar yang diinginkan pada suatu metode analisis. Namun, tidak mudah untuk mendapatkan kurva standar tersebut dikarenakan beberapa faktor. Salah satunya yaitu adanya perubahan piksel yang bervariasi ketika menggunakan kamera, dan adanya perubahan intensitas dua kali lipat dari daerah gambar yang diperoleh. Setelah didapatkan data dari berbagai sampel, data akan dimasukkan ke Microsoft Excel. Namun apabila penentuan yang dibuat hanya beberapa, maka cukup dengan membaca konsentrasi yang diketahui dari kurva standar.

II.5 Software ImageJ

ImageJ merupakan sebuah *software* yang dibuat oleh Wayne Rasband dari Research Services Branch, National Institute of Mental Health (NIH) Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan di Bethesda, Maryland, Amerika Serikat yang digunakan untuk pengolahan gambar digital yang berbasis *Java*. ImageJ telah digunakan secara luas dalam bidang kesehatan dan biologi, terutama untuk analisis (Abràmoff, Magalhães, & Ram, 2004).

Software ImageJ memakai format gambar dalam bentuk JPEG atau TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan pemilihan warna domain terbaik. 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 (Kurniawan, Waluyo, & Perdamean Sebayang, 2011).

ImageJ membantu stacks, serangkaian gambar yang ditampilkan dengan satu jendela dan multiurutan sehingga memakan waktu operasi, seperti pembacaan berkas gambar yang dapat ditunjukkan secara paralel dengan operasi lainnya. ImageJ juga dapat menghitung nilai area dan piksel dari suatu gambar yang diinginkan, dapat mengukur jarak dan sudut, dapat membuat profil dari densitogram dan garis kurva. Program ini didukung dengan berbagai pengatur gambar, seperti pengatur ketajaman, kehalusan, kecerahan, warna, sudut, dan filter dari gambar yang akan diolah. Selain itu, dapat membantu dalam melakukan transformasi geometris, seperti scaling, rotasi, dan membalik. *Software* ImageJ memakai format gambar seperti TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS, dan gambar mentah (Ferreira & Rasband, 2011)

II.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dapat dikatakan sebagai tindakan penilaian terhadap parameter yang didasarkan pada percobaan di laboratorium, dimana hal itu bertujuan untuk membuktikan apakah parameter tersebut memenuhi persyaratan atau tidak. Hal ini dilakukan untuk menjamin bahwa setiap pengukuran serupa yang dilakukan di masa yang akan datang akan menghasilkan nilai terhitung (*calculated value*) yang cukup dekat atau sama dengan nilai sebenarnya (*true value*) dari jumlah analit yang terdapat

dalam sampel. Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan sudah valid dan kesalahan yang terjadi masih dalam batas yang diizinkan (Rohman & Ganjar, 2009).

Parameter-parameter validasi metode analisis meliputi :

1. Spesifisitas (selektivitas)

Spesifitas yaitu kemampuan untuk mengukur analit secara tepat dan juga spesifik, dengan adanya komponen-komponen lain yang terdapat pada matriks sampel, contohnya seperti komponen matriks, ketidakmurnian, dan produk degradasi. Sedangkan untuk selektivitas merupakan suatu level yang mana suatu metode analisis dapat mengkuantifikasi analit secara akurat dengan adanya pengganggu dibawah kondisi uji yang telah ditentukan untuk matriks sampel yang akan di analisis (Rohman & Ganjar, 2009).

2. Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan, dan sebagai ukuran baik dan bagusnya kurva kalibrasi, dimana kurva kalibrasi ini menghubungkan konsentrasi (x) dengan respon (y). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Untuk menentukan nilai kemiringan (*slope*), koefisien korelasi dan intersep, harus diproses dengan metode kuadrat terkecil, dari data yang diperoleh (Rohman & Ganjar, 2009).

Sebagai parameter, adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (R) pada regresi linier $y = bx + a$, selain itu simpangan baku residual ($S_{y/x}$) juga harus dihitung sebagai parameter. Semua perhitungan tersebut dapat dihitung dengan menggunakan kalkulator ataupun dengan perangkat lunak komputer. Simpangan baku residual dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

3. Sensitivitas

Uji sensitivitas meliputi batas deteksi dan batas kuantisasi. Batas deteksi adalah suatu parameter untuk penentuan suatu sampel dengan kadar yang terkecil akan tetapi masih memberikan tanggap detektor yang berbeda dengan pembanding atau tanpa sampel. Sedangkan batas kuantisasi adalah kadar terkecil dari sampel yang dapat dianalisis dengan hasil penentuan kuantitatif yang menunjukkan akurasi dan presisi yang memadai (Harminta, 2004).

Batas deteksi dan kuantisasi dapat dihitung secara statistik dengan garis linier dari kurva kalibrasi, menggunakan persamaan linier $y = bx + a$. Nilai b dari persamaan linier akan sama dengan nilai pengukuran, dan nilai simpangan residual ($S_{y/x}$) akan sama dengan nilai simpangan baku blanko. Batas deteksi dan batas kuantisasi dapat dinyatakan menggunakan rumus :

$$BD = \frac{3 \frac{S_y}{x}}{\text{slope}}$$

$$BK = \frac{10 \frac{S_y}{x}}{\text{slope}}$$

4. Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Range nilai % recovery analit yang dapat diterima adalah 90-110%. Range tersebut bersifat fleksibel tergantung dari kondisi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Menurut (Harminta, 2004), akurasi merupakan persen perolehan kembali (*recovery*) dari analit yang ditambahkan. Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu, metode simulasi (*spike-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Pada metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan kedalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi, lalu campuran tersebut dianalisis kemudian hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan. Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dapat dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya, dengan rumus sebagai berikut :

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

5. Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran keterulangan metode analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel yang sama. Presisi biasanya dinyatakan dalam koefisien variasi (KV). Suatu metode dapat dinyatakan memiliki presisi yang baik apabila memiliki $KV < 2\%$ (Harminta, 2004).

Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan atau ketertiruan. Keterulangan adalah presisi metode yang jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah presisi metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda.

Presisi dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

- a. Standar deviasi (SD)

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

- b. Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV)

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

II.7 Sistem KLT yang Digunakan pada Pseudoefedrin HCl dan Triprolidin HCl

Menurut beberapa penelitian, pengembang yang dapat digunakan untuk penetapan kadar pseudoefedrin HCl dan triprolidin HCl sebagai berikut :

Tabel II. 1 Sistem KLT yang digunakan dalam Pseudoefedrin HCl dan Triprolidin HCl

Peneliti	Sampel	Fase gerak (pengembang)	Rf
(Leswara, 2007)	Pseudoefedrin HCl	Metanol, ammonia, dan kloroform (40:2:30)	0,65
(Leswara, 2007)	Triprolidin HCl	Metanol, ammonia, dan kloroform (40:2:30)	0,36
(Asnawi, Febrina, & Dinata, 2017)	Pseudoefedrin HCl	Metanol dan ammonia (10:4 tetes)	0,35