

**PENETAPAN KADAR KOMBINASI ANTIBIOTIK SULFAMETOKSAZOL  
DAN TRIMETOPRIM (KOTRIMOKSAZOL) DALAM SEDIAAN  
SUSPENSI MENGGUNAKAN KLT VIDEO DENSITOMETRI**

**Laporan Tugas Akhir**

**BENY PUTRA SANDY  
191FF04010**



**Universitas Bhakti Kencana  
Fakultas Farmasi  
Program Strata I Farmasi  
Bandung  
2021**

**ABSTRAK****PENETAPAN KADAR KOMBINASI ANTIBIOTIK SULFAMETOKSAZOL  
DAN TRIMETOPRIM (KOTRIMOKSAZOL) DALAM SEDIAAN SUSPENSI  
MENGUNAKAN KLT VIDEO DENSITOMETRI****Oleh :****Beny Putra Sandy****191FF04010**

Kotrimoksazol adalah kombinasi antara sulfametoksazol dan trimetoprim. Metode analisis sediaan suspensi kotrimoksazol umumnya menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Metode tersebut memerlukan instrument yang mahal dan preparasi yang lebih rumit. Sehingga diperlukan metode alternatif yang lebih sederhana, namun tetap akurat dan presisi. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan apakah KLT Video densitometri dapat menjadi metode analisis alternatif untuk analisis sediaan suspensi kotrimoksazol. Jenis penelitian ini bersifat eksperimental. Penelitian ini dilakukan dalam 4 tahapan yaitu pemeriksaan bahan baku, optimasi sistem kromatografi, validasi metode analisis, dan penetapan kadar sediaan. Berdasarkan penelitian ini didapatkan hasil sistem kromatografi yang baik dengan fase diam berupa plat silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak etil asetat: metanol: ammonia (8,5: 1,5: 0,3, v/v). Dimana nilai R<sub>f</sub> sulfametoksazol dan trimetoprim berturut-turut adalah 0,65 dan 0,79. Persamaan kurva kalibrasi untuk sulfametoksazol  $y = 2,6966x - 645,26$  dan untuk trimetoprim  $y = 5,4301x - 2091,4$ . Hasil penetapan kadar sediaan suspensi kotrimoksazol memberikan hasil kadar sulfametoksazol 107,70% dan terimetoprim 90,24%. Akurasi metode ini cukup baik yaitu sebesar  $101,12\% \pm 0,056\%$  sulfametoksazol dan trimetoprim  $99,97\% \pm 0,29\%$ . Sedangkan presisinya masih kurang baik. Dimana nilai %KV sulfametoksazol 2,49% dan trimetoprim 3,03%.

**Kata Kunci:** KLT Video densitometri, Sulfametoksazol, Trimetoprim

**ABSTRACT****DETERMINATION OF COMBINATION LEVELS OF ANTIBIOTIC  
SULFAMETOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM (COTRIMOXAZOLE) IN  
SUSPENSION PREPARATION USING TLC VIDEO DENSITOMETRY**

By:

Beny Putra Sandy

191FF04010

Cotrimoxazole is a combination of sulfomethoxazole and trimethoprim. The method of analysis of cotrimoxazole suspension preparations generally uses high performance liquid chromatography. This method requires expensive instruments and more complicated preparation. So we need an alternative method that is simpler, but still accurate and precise. The purpose of this study was to determine whether TLC Video densitometry can be an alternative analytical method for the analysis of cotrimoxazole suspension preparations. This type of research is experimental. This research was carried out in 4 stages, namely inspection of raw materials, optimization of the chromatographic system, validation of analytical methods, and determination of dosage levels. Based on this research, the results of a good chromatographic system were obtained with a stationary phase in the form of a silica gel plate GF 254 and a mobile phase of ethyl acetate : methanol : ammonia (8.5 : 1.5 : 0.3 v/v). Where the R<sub>f</sub> values of sulfamethoxazole and trimethoprim were 0.65 and 0.79, respectively. The equation of the calibration curve for sulfamethoxazole  $y = 2,6966x - 645.26$  and for trimethoprim  $y = 5,4301x - 2091,4$ . The results of the determination of the concentration of cotrimoxazole suspension preparations gave 107.70% of sulfamethoxazole and 90.24% of trimethoprim. The accuracy of this method is quite good, namely  $101.12\% \pm 0.056\%$  sulfamethoxazole and  $99.97\% \pm 0.29\%$  trimethoprim. While the precision is still not good. Where the % KV value of sulfamethoxazole is 2.49% and trimethoprim is 3.03%.

Keywords: TLC Video densitometry, Sulfomethoxazole, Trimethoprim

**LEMBAR PENGESAHAN**

**PENETAPAN KADAR KOMBINASI ANTIBIOTIK SULFAMETOKSAZOL  
DAN TRIMETOPRIM (KOTRIMOKSAZOL) DALAM SEDIAAN SUSPENSI  
MENGUNAKAN KLT VIDEO DENSITOMETRI**

**Laporan Tugas Akhir**

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**BENY PUTRA SANDY  
191FF04010**

Bandung, 17 Juli 2021

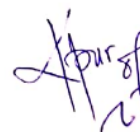
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Dr. Apt. Fauzan Zein Muttaqin, M.Si.)  
NIDN. 0424117601

Pembimbing Serta,



(apt. Purwaniati, M.Si)  
NIDN. 0403018206

## KATA PENGANTAR

Puji beserta syukur saya haturkan kepada Allah SWT karena atas berkah dan rahmat-Nya lah, penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir dengan judul **“Penetapan Kadar Kombinasi Antibiotik Sulfametoksazol Dan Trimetoprim (Kotrimoksazol) Dalam Sediaan Suspensi Menggunakan Klt Video Densitometri”**.

Laporan tugas akhir ini bertujuan untuk memenuhi persyaratan program studi Sarjana Farmasi kelulusan Universitas Bahkti Kencana Bandung. Dalam proses penulisan laporan tugas akhir ini, bantuan dari semua pihak tidak dapat dipisahkan, dan dengan ini penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Orang tua tersayang, bapak Afri dan ibu Camurni S.Pd yang selalu memberikan dorongan berupa semangat, materi dan motivasi untuk mendukung, membimbing dan menyemangati penulis dari awal kuliah sampai saat mengerjakan laporan tugas akhir ini.
2. Dr. apt. Fauzan Zein Muttaqin, M.Si selaku pembimbing utama yang telah menyempatkan waktu, pikiran, bimbingan serta pengarahan kepada penulis selama penulisan laporan tugas akhir ini.
3. apt. Purwaniati, M.Si selaku pembimbing serta yang telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis.
4. Seluruh dosen-dosen pengajar Universitas Bahkti Kencana Bandung yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan membantu peneliti selama pendidikan.

Penulis menyadari bahwa karena keterbatasan pengalaman dan pengetahuan penulis, laporan akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis berharap agar semua pihak dapat menyampaikan saran dan pendapat dalam berbagai bentuk, bahkan memberikan kritik yang membangun. Semoga laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan semua pihak khususnya di bidang farmasi.

Terima Kasih.

Bandung, Juli 2021

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG</b> .....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian</b> .....	2
<b>1.4 Hipotesis Penelitian</b> .....	2
<b>1.5 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	2
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
<b>2.1 Zat Aktif</b> .....	3
<b>2.1.1 Sulfametoksazol</b> .....	3
<b>2.1.2 Trimetoprim</b> .....	4
<b>2.1.3 Ko-trimoksazol</b> .....	5
<b>2.1.3.1 Farmakologi</b> .....	5
<b>2.1.3.2 Farmakokinetik</b> .....	7
<b>2.2 Kromatografi Lapis Tipis</b> .....	7
<b>2.2.1 Prinsip KLT</b> .....	8
<b>2.2.2 Fase Diam dan Fase Gerak KLT</b> .....	8
<b>2.2.3 Aplikasi Penotolan dan Pengembangan Sampel</b> .....	8
<b>2.2.4 Skrining Sistem Kromatografi</b> .....	8
<b>2.3 KLT Video densitometri</b> .....	10
<b>2.4 Validasi Metode</b> .....	11
<b>2.4.1 Selektifitas/Spesifitas</b> .....	11
<b>2.4.2 Linearitas</b> .....	12
<b>2.4.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)</b> .....	12
<b>2.4.4 Presisi</b> .....	12
<b>2.4.5 Akurasi</b> .....	13
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	14
<b>BAB IV. ALAT DAN BAHAN</b> .....	15
<b>4.1 Alat</b> .....	15

4.2 Bahan .....	15
<b>BAB V. PROSEDUR PENELITIAN</b> .....	16
5.1 Pemeriksaan Bahan Baku .....	16
5.2 Optimasi Sistem Kromatografi .....	16
5.2.1 Pembuatan Larutan Induk dan Larutan Baku.....	16
5.2.2 Penyiapan Fase Diam .....	16
5.2.3 Penyiapan Fase Gerak .....	16
5.2.4 Penotolan .....	17
5.2.5 Pengembangan .....	17
5.2.6 Penampakan dan Perekaman Bercak .....	17
5.2.7 Analisa Kromatogram.....	17
5.2.8 Preparasi Larutan Sampel Tablet Kotrimoksazol.....	18
5.3 Validasi Metode .....	18
5.3.1 Selektivitas.....	18
5.3.2 Linearitas.....	19
5.3.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi .....	19
5.3.4 Akurasi .....	19
5.3.5 Presisi.....	20
5.4 Penetapan Kadar Sampel.....	20
<b>BAB VI. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	21
6.1 Pemeriksaan Bahan Baku .....	21
6.2 Pencarian Kondisi Otimum.....	21
6.2.1 Optimasi pelarut .....	21
6.2.2 Optimasi Ukuran Plat .....	21
6.2.3 Optimasi Fase Gerak.....	22
6.3 Penentuan Kosentrasi Terendah Baku Sulfametoksazol dan Trimetoprim.....	24
6.4 Pengukuran Bercak secara densitometri .....	24
6.5 Hasil Validasi Metode.....	25
6.5.1 Selektivitas.....	25
6.5.2 Linearitas.....	26
6.5.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi .....	29
6.5.4 Uji akurasi .....	30
6.5.5 Uji Presisi.....	30
6.6 Penetapan Kadar Sampel.....	31
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	33
7.1 Kesimpulan .....	33

<b>7.2 Saran</b> .....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	35



**DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI**

Gambar 2.1 Struktur Kimia Sulfametoksazol .....	3
Gambar 2.2 Struktur Kimia Trimetoprim .....	4
Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Sulfonamida dan Trimetoprim .....	5
Gambar 2.4 Perhitungan Nilai Rf Dalam Kromatografi Lapis Tipis.....	11
Gambar 6.1 Baku Trimetoprim dengan Pelarut NaOH 0,1N.....	21
Gambar 6.2 Optimasi Ukuran plat .....	22
Gambar 6.3 Penentuan Kosentrasi Terendah Baku Sulfametoksazol dan Trimetoprim Secara Visual .....	24
Gambar 6.4 Pengukuran Densitas Bercak dengan <i>Software ImageJ</i> .....	25
Gambar 6.5 Hasil Validasi Selektifitas .....	26
Gambar 6.6 Kurva Kalibrasi Sulfametoksazol.....	27
Gambar 6.7 Kurva Kalibrasi Trimetoprim .....	28

**DAFTAR TABEL**

Tabel II.1 Sistem Kromatografi Sulfametoksazol dan Trimetoprim .....	9
Tabel V.1 Komposisi Sampel Simulasi .....	20
Tabel VI.1 Optimasi Fase Gerak .....	22
Tabel VI.2 Data Hasil Kurva Kalibrasi Sulfametoksazol .....	27
Tabel VI.3 Data Hasil Kurva Kalibrasi Trimetoprim .....	28
Tabel VI.4 Hasil Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi .....	29
Tabel VI.5 Hasil Perhitungan Akurasi .....	30
Tabel VI.6 Hasil Perhitungan Presisi Antara .....	31
Tabel VI.7 Hasil Perhitungan Presisi Interday .....	31
Tabel VI.8 Penetapan Kadar Sampel Sulfametoksazol .....	32
Tabel VI.9 Penetapan Kadar Sampel Trimetoprim .....	32

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Surat Pernyataan Bebas Plagiarism.....	xiii
Lampiran 2. Surat Persetujuan Dipublikasikan di Media Online .....	xiv
Lampiran 3. Sertifikat Analisis Baku Pembanding .....	xv
Lampiran 4. Data Uji Selektifitas .....	xvi
Lampiran 5. Perhitungan Selektivitas .....	xvii
Lampiran 6. Data Uji Sensitivitas dan Uji Linearitas .....	xviii
Lampiran 7. Data Hasil Linearitas .....	xix
Lampiran 8. Kurva Kalibrasi Senyawa .....	xx
Lampiran 9. Perhitungan Batas Deteksi, Batas Kuantitasi dan Perhitungan $V_{x0}$ .....	xxi
Lampiran 10. Data Uji Akurasi .....	xxiii
Lampiran 11. Hasil Presisi Antara .....	xxv
Lampiran 12. Hasil Presisi Interday .....	xxvi
Lampiran 13. Penetapan Kadar Sampel .....	xxix

## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

### SINGKATAN

KLT  
KCKT  
DHPte  
PABA  
Rf

### NAMA

Kromatografi Lapis tipis  
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi  
*Dihydropteroate*  
*Para Amino Benzoat Acid*  
*Retention Factor*

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Menurut *National Center for Biotechnology Information* (2021) Kotrimoksazol adalah kombinasi antibiotik antara sulfametoksazol dan trimetoprim. Kotrimoksazol banyak digunakan untuk infeksi bakteri ringan sampai sedang dan sebagai profilaksis melawan infeksi oportunistik. Seperti obat lain yang mengandung sulfonamida, kombinasi ini telah dikaitkan dengan kasus langka seperti cedera hati akut yang terlihat secara klinis.

Kotrimoksazol dalam sediaan tablet dengan kekuatan sediaan 400 mg sulfametoksazol dan 80 mg trimetoprim (400/80 mg). Sedangkan yang forte mengandung 800/160 mg. Sediaan suspensi oral dengan dosis 200/40 mg setiap 5 ml, dan juga tersedia tablet 100/20 mg. Sulfametoksazol memiliki sifat antagonis dan kompetitif dari ester asam para-aminobenzoat dengan mengubah asam para-aminobenzoat menjadi koenzim dihidrofolat (bentuk tereduksi dari asam folat) (Septiani, 2015).

Trimetoprim adalah penghambat dihidrofolat reduktase, yang mempengaruhi metabolisme nukleoprotein mikroba dengan mengganggu sistem asam folat-folinat (Septiani, 2015). Sulfametoksazol dan trimetoprim dapat digunakan dalam kombinasi karena efek sinergisnya (Muttaqin et al., 2016).

Metode analisis untuk menentukan kandungan senyawa suspensi kotrimoksazol (sulfametoksazol dan trimetoprim) adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Kemenkes Indonesia, 2014). Sedangkan penelitian yang akan dilakukan menggunakan metode KLT video densitometri. Metode ini dipilih karena mudah dalam pengoperasiannya dan dapat dikembangkan sebagai alternatif metode KCKT. KCKT dapat menganalisa berbagai preparat multi komponen dalam kondisi analitik yang optimal dan memiliki hasil yang baik, namun kekurangannya adalah peralatan yang digunakan mahal. (Muttaqin et al., 2016).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik menggunakan KLT video densitometri untuk menganalisis kadar dari kombinasi obat kotrimoksazol. Penelitian ini layak dilakukan karena penetapan kadar merupakan suatu syarat wajib dalam menjamin kualitas sediaan obat. Hasil penelitian ini nantinya dapat digunakan sebagai informasi tambahan kepada peneliti lainnya.

## **1.2 Rumusan masalah**

Dari latar belakang diatas, didapati rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah suspensi sulfametoksazol dapat di analisis menggunakan KLT Video densitometri ?
2. Berapakah kadar sulfametoksazol dan trimetoprim yang terkandung dalam sediaan suspensi kotrimoksazol menggunakan KLT Video densitometri?

## **1.3 Tujuan dan manfaat penelitian**

Untuk mengetahui kadar sulfametoksazol dan trimetoprim dalam sediaan suspensi kotrimoksazol menggunakan KLT video densitometri.

## **1.4 Hipotesis penelitian**

Kadar sulfametoksazol dan trimetoprim sesuai dengan ketentuan yang terkandung dalam Farmakope Indonesia.

## **1.5 Tempat dan waktu Penelitian**

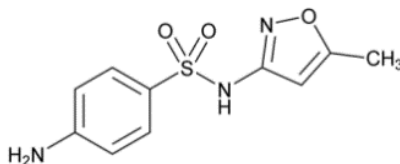
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana. Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Maret-Juni tahun 2021.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Zat Aktif

#### 2.1.1 Sulfametoksazol

Sulfametoksazol mempunyai struktur kimia sebagai berikut :



Gambar 2.1 Struktur Kimia Sulfametoksazol (Kemenkes Indonesia, 2020)

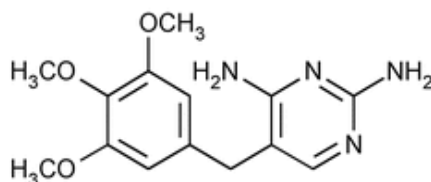
Merk Dagang	: Sanprima <sup>®</sup> , Ottoprim <sup>®</sup> , Trimoxsul <sup>®</sup>
Sinonim	: Sulfisomazol
Rumus Molekul	: C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
Berat Molekul	: 235, 28 g/mol
pK <sub>a</sub> (Keasaman)	: 5.6
Kegunaan	: antibakteri
Pemerian	: serbuk hablur, putih sampai hampir putih; praktis tidak berbau.
Kelarutan	: Praktis tidak larut dalam air, dalam eter dan dalam kloroform; mudah larut dalam aseton dan dalam larutan natrium hidroksida encer; agak sukar larut dalam etanol (Kemenkes RI, 2014).
Titik Lebur	: 167°C (Kemenkes Indonesia, 2020; Kemenkes RI, 2014; Moffat et al., 2011; ISO Vol 51, 2018).

Sulfametoksazol adalah antibiotik sulfonamida spektrum luas digunakan untuk bakteri aerobik gram negatif dan gram positif, protozoa, dan untuk beberapa infeksi jamur. Sulfametoksazol menghambat produksi dihydropteroate (DHPte) dari dua prekursor folat asam, asam p-aminobenzoic (PABA) dan 6-hidroksimetil-7,8- dihidropterin pirofosfat (DHPPP). Reaksi dikatalis oleh enzim dihydropteroyl synthetase (DHPS). Biologis properti dari Sulfametoksazol dan antibiotik sulfonamida lainnya adalah hasilnya penghambatan kompetitif DHPS. Sebagai konsekuensi dari pemblokiran ini enzim, pertumbuhan dan reproduksi bakteri dihambat. Di Sebaliknya, trimetoprim menghambat penurunan dihidrofolat (DBD) menjadi tetrahidrofolat (THF) (Drzymała & Kalka, 2020).

Menurut *National Center for Biotechnology Information* (2021) Sulfametoksazol adalah antibiotik sulfonamida bakteriostatik yang mengganggu sintesis asam folat pada bakteri yang rentan. Ini umumnya diberikan dalam kombinasi dengan [trimetoprim], yang menghambat langkah sekuensial dalam sintesis asam folat bakteri. Agen ini bekerja secara sinergis untuk memblokir dua langkah berturut-turut dalam biosintesis asam nukleat dan protein yang diperlukan untuk pertumbuhan dan pembelahan bakteri, dan menggunakan mereka dalam hubungannya membantu memperlambat perkembangan resistensi bakteri. Dalam kombinasi ini, sulfametoksazol berguna untuk pengobatan berbagai infeksi bakteri, termasuk infeksi saluran kemih, pernapasan, dan gastrointestinal.

### 2.1.2 Trimetoprim

Trimetoprim mempunyai struktur kimia sebagai berikut :



Gambar 2.2 Struktur Kimia Trimetoprim (Kemenkes Indonesia, 2020)

Merk Dagang	: Sanprima <sup>®</sup> , Ottoprim <sup>®</sup> , Trimoxsul <sup>®</sup>
Sinonim	: Thrimethoprimum; Trimethoxyprim
Rumus Molekul	: C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
Berat Molekul	: 290, 32 g/mol
pK <sub>a</sub>	: 7.2; 6.6
Kegunaan	: antibakteri
Pemerian	: hablur atau serbuk hablur; putih sampai krem; tidak berbau
Kelarutan	: Larut dalam benzil alkohol; agak sukar larut dalam kloroform dan dalam metanol; sangat sukar larut dalam air, dalam etanol dan dalam aseton; praktis tidak larut dalam eter dan dalam karbon tetraklorida.
Titik Lebur	: 199°C – 203°C (Kemenkes Indonesia, 2020; Kemenkes RI, 2014; Moffat et al., 2011; ISO Vol 51, 2018).



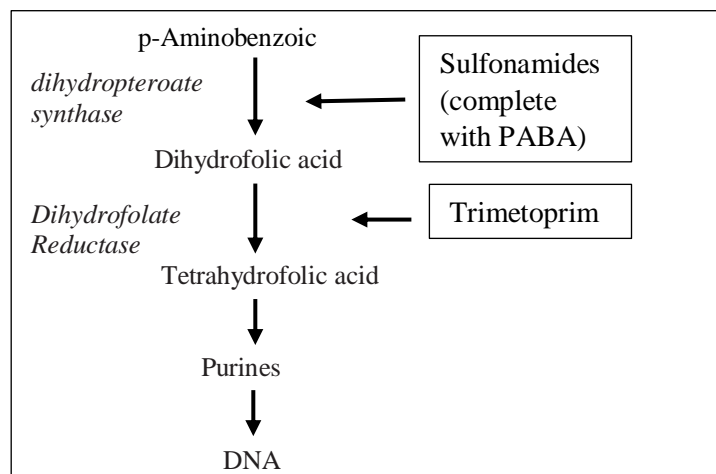
Menurut *National Center for Biotechnology Information* (2021) Trimetoprim adalah turunan sintetik trimethoxybenzyl-pyrimidine dengan sifat antibakteri dan antiprotozoal. Sebagai penghambat pirimidin dari bakteri dihidrofolat reduktase, trimetoprim mengikat erat enzim bakteri, menghalangi produksi asam tetrahidrofolat dari asam dihidrofolat. Aktivitas antibakteri dari agen ini diperkuat oleh sulfonamida. Trimetoprim adalah bubuk putih yang tidak berbau. Rasa pahit. Sulfametoksazol dengan trimetoprim adalah kombinasi antibiotik tetap yang banyak digunakan untuk infeksi bakteri ringan hingga sedang dan sebagai profilaksis melawan infeksi oportunistik. Seperti obat lain yang mengandung sulfonamida, kombinasi ini telah dikaitkan dengan kasus langka cedera hati akut yang terlihat secara klinis.

### 2.1.3 Kotrimoksazol

Suspensi oral kotrimoksazol mengandung sulfametoksazol ( $C_{10}H_{11}N_3O_3$ ) dan trimetoprim ( $C_{14}H_{18}N_4O_3$ ). Kandungan tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari isi yang tertera pada etiket (Kemenkes Indonesia, 2020).

#### 2.1.3.1 Farmakologi

Sulfametoksazol biasanya dikombinasikan bersama trimetoprim membentuk kotrimoksazol agar meningkatkan aktivitasnya. Kombinasi sulfametoksazol dan trimetoprim mempunyai mekanisme kerja yang bersifat sinergis. Trimetoprim menghambat produksi asam tetrahidrofolat terhadap asam dihidrofolat dengan memblok enzim bakteri dihidrofolat reduktase. Sementara sulfametoksazol menghambat sintesis asam dihidrofolat, sehingga bakteri bersaing dengan *Para Amino Benzoat Acid* (PABA). Kombinasi agen ini mencegah dua langkah yang terlibat dalam biosintesis asam nukleat esensial dan protein esensial pada banyak bakteri. (Nafianti & Sinuhaji, 2016).



Gambar 2.3 Mekanisme kerja sulfonamida dan trimethoprim (Katzung et al., 2012)

Tidak seperti mamalia, mikroorganisme yang sensitif terhadap sulfonamida tidak bisa memakai folat eksogen tetapi mesti mensintesisnya dari asam PABA (*Para Amino Benzoat Acid*). Oleh karena itu, jalur ini sangat penting untuk produksi purin dan sintesis asam nukleat. Sebagai analog struktural PABA, sulfonamid dapat menghambat produksi sintase dan folat dihidropteorat. Trimetoprim dapat selektif menghambat reduktase asam dihidrohidrofilik bakteri, yang mengubah asam hidrohdrofilik menjadi asam tetrahidrofolat, yang merupakan langkah pertama dalam sintesis purin dan akhirnya ke DNA. (Katzung et al., 2012).

Kotrimoksazol merupakan obat pilihan pertama yang digunakan dalam pengobatan Shigellosis, yang bekerja menghambat sintesis asam folat. Koenzim asam folat adalah senyawa yang dipergunakan dalam proses sintesis purin dan pirimidin (prekursor DNA dan RNA), senyawa ini diperlukan untuk perkembangan sel dan replikasi sel bakteri. Tanpa asam folat, sel-sel pada bakteri tidak dapat tumbuh atau membelah (Nafianti & Sinuhaji, 2016).

Menurut *Team Medical Mini Notes* (2019) Kombinasi kedua obat ini bersifat bakteriasid sedangkan sifat dari sulfonamida secara tunggal bersifat bakteriostatik. Untuk memperoleh sinergi obat tersebut perlu dilakukan perbandingan kadar optimum dari kedua senyawa (sulfametoksazol dan trimetoprim) dengan perbandingan yang tersedia adalah 5: 1.

Komposisi dan Dosis Kotrimoksazol:

1) Komposisi

- a. Setiap tablet kotrimoksazol mengandung 80 mg trimetoprim dan 400 mg sulfametoksazol.
- b. Tablet kekuatan ganda/forte mengandung trimetoprim 160 mg dan sulfametoksazol 800 mg.
- c. Sedangkan untuk sirup anak-anak mengandung 200 sulfametoksazol dan 40 mg trimetoprim per 5 ml, serta tablet 100/20 mg.

2) Dosis

- a. Untuk umur 6 minggu sampai 6 bulan, 120 mg: 2 kali sehari.
- b. Untuk umur 6 bulan sampai 6 tahun: 2 kali sehari.
- c. Untuk umur 6-12 tahun, 480 mg: 2 kali sehari.
- d. Dan untuk dosis dewasa dan anak-anak di atas 12 tahun, 960 mg: 2 kali sehari (ISO Vol 51, 2017).

### 2.1.3.2 Farmakokinetik

Trimetoprim biasanya diberikan secara oral dan bisa dipakai tunggal atau kombinasi dengan sulfametoksazol dengan waktu paruh yang serupa. Trimetoprim dan sulfametoksazol intravena juga diserap secara baik dari usus dan didistribusikan secara luas dalam cairan dan jaringan tubuh (termasuk cairan serebrospinal). Karena trimetoprim lebih larut dalam lemak daripada sulfametoksazol, trimetoprim memiliki volume distribusi yang lebih besar daripada sulfametoksazol. Maka, ketika 1 bagian trimetoprim dan 5 bagian sulfametoksazol (rasio dalam sediaan) digunakan bersama-sama, konsentrasi plasma puncak adalah dalam 1:20, yang merupakan kombinasi terbaik untuk obat in vitro. Dalam 24 jam, sekitar 30-50% sulfonamid dan 50-60% trimetoprim (atau metabolitnya masing-masing) diekskresikan dalam urin. Dosis harus dikurangi setengahnya untuk membersihkan kreatinin pasien pada 15-30 mL / menit. Trimetoprim (basa lemah) terkonsentrasi pada cairan prostat dan cairan vagina yang lebih asam dari plasma. Maka, ia memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang lebih besar pada prostat dan cairan vagina dibandingkan banyak agen antibakteri yang lain. (Katzung et al., 2012).

### 2.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) pertama kali dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. Kromatografi lapis tipis adalah bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Perbedaan dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas didalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya merupakan lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Meskipun begitu kromatografi planar ini bisa dibilang sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kertas. Fase gerak diketahui sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau adanya pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*discending*) (Rohman dan Gandjar, 2007).

Metode KLT adalah yang paling banyak efektif untuk analisis biaya rendah dari sejumlah besar sampel (misalnya obat skrining dalam cairan dan jaringan biologis, penentuan tumbuhan asal dan potensi jamu tradisional, uji stabilitas dan pengujian keseragaman konten), untuk analisis cepat sampel itu memerlukan pembersihan sampel minimal, atau jika KLT memungkinkan pengurangan jumlah langkah persiapan sampel (misalnya analisis sampel yang mengandung komponen yang tetap diserap ke fase diam atau mengandung mikropartikel tersuspensi). KLT

juga lebih disukai untuk analisis zat dengan karakteristik pendeteksian yang buruk yang memerlukan perawatan kimia pasca-kromatografi untuk pendeteksian (Moffat et al., 2011).

### **2.2.1 Prinsip KLT**

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan pemisahan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang di gunakan. Teknik ini biasanya menggunakan fasa diam berupa pelat silika dan menyesuaikan fasa gerak sesuai jenis sampel yang akan dipisahkan. Larutan atau campuran tersebut disebut juga dengan eluen. Semakin dekat polaritas antara sampel dan eluen, semakin banyak sampel yang diambil fasa gerak (Fitriawati, 2016).

### **2.2.2 Fase Diam dan Fase Gerak KLT**

Pada metode KLT, fase diam yang digunakan berupa penyerap yang memiliki diameter partikel antara 10-30  $\mu\text{m}$ . semakin kecil ukuran rata-rata partikel fasa diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Penyerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa. Fase gerak pada KLT dapat dipilih melalui pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena 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 (Rohman dan Gandjar, 2007).

### **2.2.3 Aplikasi Penotolan dan Pengembangan Sampel**

Pemisahan yang optimal pada KLT akan didapatkan jika penotolan sampel dengan ukuran sesempit dan sekecil mungkin. Apabila sampel telah ditotolkan tahapan selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dipenuhi uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang sudah ditotoli sampel dicelupkan fase gerak kurang lebi 0,5-1 cm. tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang tela terisi totolan sampel (Rohman dan Gandjar, 2007).

### **2.2.4 Skrining Sistem Kromatografi**

Sistem TLC yang diberikan di bawah ini adalah metode penyaringan umum untuk nitrogen basa (sistem TA, TB, TC, TL, TAE dan TAF), untuk asam dan senyawa netral (sistem TD, TE, TF dan TAD).

Tabel II.1 Sistem Kromatografi Sulfametoksazol dan Trimetoprim (Moffat et al., 2011)

<b>Sistem Kromatografi</b>	<b>Rf</b>	
	Sulfametoksazol	Trimetoprim
<b>TA</b>	0,65	0,55
<b>TB</b>	-	00
<b>TC</b>	-	0,22
<b>TD</b>	0,26	-
<b>TE</b>	0,05	0,45
<b>TL</b>	-	0,12
<b>TP</b>	0,54	-
<b>TT</b>	0,88	-
<b>TU</b>	0,33	-
<b>TV</b>	0,02	-
<b>TAD</b>	0,41	0,20
<b>TAE</b>	0,79	0,45
<b>TAJ</b>	0,45	0,14
<b>TAK</b>	0,26	0,08
<b>TAL</b>	0,81	0,66

### 1.2 Sistem TA

- a. Pelat: Silica gel G, tebal 250 mm, dicelupkan atau disemprot dengan, 0,1 mol / L kalium hidroksida dalam metanol, dan dikeringkan.
- b. Fase gerak: Larutan amonia kuat metanol (100: 1.5).
- c. Penampak bercak (Ninhydrin spray, FPN reagent, Dragendorff spray, Marquis reagent).

### 2. Sistem TAD

- a. Pelat: Silica gel G, tebal 250 mm.
- b. Fase gerak: Kloroform-metanol (90: 10).
- c. Penampak bercak Van Urk's reagent, Ferric chloride solution, Furfuraldehyde reagent).

### 3. Sistem TAE

- a. Pelat: Silica gel G, tebal 250 mm.
- b. Fase gerak: Metanol.

- c. Penampak bercak (Van Urk's reagent, Ferric chloride solution, Furfuraldehyde reagent) (Moffat et al., 2011).

### 2.3 KLT Video densitometri

KLT video densitometri adalah teknologi pertama yang menggunakan kamera digital dan analisis perangkat lunak untuk memisahkan nilai kecerahan merah, hijau, dan biru pada gambar pelat KLT untuk membuat pemindaian multispektral. Ini seperti spektrofotometer sederhana dan mudah digunakan. KLT Densitometri menggunakan pelat KLT fluoresensi yang umum digunakan (bukan pelat HPTLC), kamera digital dengan kontrol eksposur manual, dan peralatan KLT konvensional. KLT Densitometri dapat digunakan di institusi mana pun, tetapi sangat cocok untuk sekolah menengah dan universitas yang tidak memiliki anggaran untuk membeli peralatan analisis KLT yang lebih mahal (Hess, 2007 dalam Muttaqin et al., 2016).

Prinsip metode KLT Video densitometri dilakukan secara elektronik, menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator, dan perangkat optik yang sesuai untuk menerangi pelat KLT dan memfokuskan gambar pada perangkat kamera video (*charge-coupled*). Daya tarik utama metode KLT Video densitometri untuk deteksi kromatografi lapis tipis adalah akuisisi data yang cepat dan tersinkronisasi, desain instrumen sederhana tanpa bagian yang bergerak, sensitivitas lebih tinggi, waktu akuisisi lebih lama, dan kompatibilitas dengan analisis data. Ada 4 sumber utama saat menggunakan metode KLT Video densitometri dalam penetapan kadar ialah:

1. Penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan jarum suntik, *microcap* atau *micropipettor*.
2. Pengambilan data dengan kamera digital.
3. Kuatifikasi dengan software pengolah gambar ImageJ (Hess, 2007 dalam Muttaqin et al., 2016).
4. Diaplikasikan dengan menerapkan ke persamaan matematika sederhana untuk mengubah data asli menjadi bentuk linier (Fitriawati, 2016).

Parameter yang dipakai pada uji kesesuaian sistem dengan metode KLT adalah Rf. Usahakan untuk mendapatkan nilai Rf dengan mengubah komposisi dan kombinasi fasa gerak menjadi antara 0,2-0,8. Visualisasikan noda pada KLT menggunakan lampu UV 254 nm. Selain itu, kamera / video mirrorless digunakan untuk merekam spot / video fluorinated silica gel GF254 pada pelat KLT. Gambar Kemudian menggunakan software TLC analyzer untuk menganalisis

dan mencatat hasilnya. Setelah diperoleh uji kesesuaian sistem, maka metode analisis diverifikasi. Pengukuran yang dilakukan dengan menggunakan metode TLC densitas optik video akan dilakukan perbandingan dengan nilai yang tertera pada label dan dilakukan uji statistik (Hess, 2007 dalam Muttaqin et al., 2016).

## 2.4 Validasi Metode

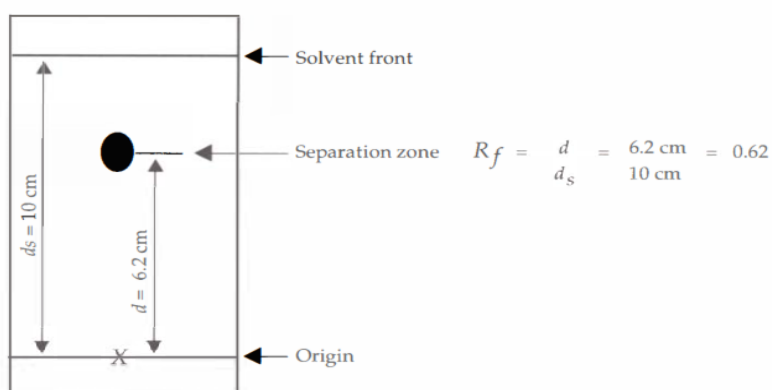
### 2.4.1 Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan untuk menguji analit secara akurat dengan adanya komponen lain, dan dianggap ada dalam bentuk kontaminan, produk degradasi, dan matriks sampel (Kemenkes Indonesia, 2020).

Selektivitas diartikan sebagai kemampuan metodologi untuk mengidentifikasi analit yang menarik dengan adanya komponen matriks dan zat yang berpotensi mengganggu. Interferensi analitik meliputi komponen matriks endogen, produk dekomposisi, metabolit dan lainnya secara struktural senyawa terkait (Bertholf & Winecker, 2007). Parameter selektivitas diperoleh dengan membandingkan  $R_f$  standar dengan  $R_f$  sampel (Asnawi et al., 2017). Rumus perhitungan nilai  $R_f$ .

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda yang digerakkan oleh zat terlarut}}{\text{Jarak noda yang digerakkan oleh fasa gerak depan}}$$

Nilai  $R_f$  memfasilitasi perbandingan ini dan digunakan sebagai panduan untuk migrasi relatif dan pengurutan komponen dalam suatu campuran. Contoh perhitungan nilai  $R_f$  adalah ditunjukkan pada gambar dibawah ini (Striegel & Jo Hill, 1996).



Gambar 2.4 Perhitungan nilai  $R_f$  dalam Kromatografi Lapis Tipis (Striegel & Jo Hill, 1996).

### 2.4.2 Linearitas

Linearitas prosedur analitik merupakan kemampuannya (dalam kisaran tertentu) untuk memperolehnya hasil tes yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel (Harron, 2013). Linearitas dievaluasi dengan menentukan koefisien korelasi ( $r$ ) ( $y = bx + a$ ) dari analisis regresi linier berdasarkan kurva standar hubungan antara luas puncak noda kromatogram dan konsentrasi zat yang diuji. (Hayun & Karina, 2016).

### 2.4.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

LOD adalah batas deteksi prosedur analitik individu adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang bisa dideteksi tetapi tidak harus dihitung secara pasti nilai (Harron, 2013). Biasanya, LOD sesuai dengan konsentrasi analit menghasilkan sinyal setidaknya tiga kali lebih besar dari kebisingan latar belakang analitik. Menetapkan LOD membutuhkan kromatografi yang dapat diterima pemisahan, prediksi waktu retensi dan, untuk aplikasi spektrometri massa (MS), rasio ion  $m/z$  yang dapat diterima (Bertholf & Winecker, 2007)

LOQ ialah batas kuantitasi prosedur analitik individu adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi yang sesuai dan akurasi. Batas kuantitatif adalah parameter uji kuantitatif yang rendah tingkat senyawa pada matriks sampel, dan digunakan khususnya untuk menentukan kotoran dan / atau produk degradasi (Harron, 2013). Dalam praktiknya, LLOQ sering berhubungan dengan sinyal 5–10 kali lebih besar dari kebisingan latar belakang analitis. Sebagai contoh, LLOQ mungkin sesuai dengan konsentrasi yang memenuhi semua kriteria LLOD, diukur dalam 10% dari target konsentrasi dan menghasilkan CV <10%. Parameter ini dapat dioptimalkan dengan memanipulasi beberapa faktor, termasuk volume spesimen, ambang detector (gain), jenis dan kondisi kolom kromatografi, prakonsentrasi analit, jumlah dan jenis standar internal, efisiensi ekstraksi dan metode analitik (Bertholf & Winecker, 2007).

### 2.4.4 Presisi

Presisi prosedur analisis merupakan kedekatan hasil pengujian individu ketika prosedur diterapkan berulang kali pada beberapa sampel atau sampel yang homogen. Presisi biasanya dinyatakan sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variabel) dan serangkaian pengukuran. Presisi adalah ukuran pengulangan atau tingkat pengulangan prosedur analitik dalam kondisi kerja normal (Kemenkes Indonesia, 2020). Deviasi standar yang dinyatakan sebagai persentase dari rata-rata:



$$CV = (\text{Standard deviasi} / \text{rata-rata}) \times 100$$

Biasanya, laboratorium harus mencapai tingkat presisi <10%; namun, di beberapa Misalnya, CV mungkin > 10%, terutama pada atau dekat batas bawah kuantitasi, ketika kebisingan latar belakang adalah porsi yang lebih besar dari sinyal total yang diukur. CV seharusnya ditentukan pada beberapa konsentrasi analit (Bertholf & Winecker, 2007).

#### 2.4.5 Akurasi

Akurasi prosedur analitik adalah derajat kedekatan antara hasil tes dan prosedur untuk memverifikasi nilai yang benar. Akurasi prosedur analisis harus ditentukan dalam rentang nilai sebenarnya (Kemenkes Indonesia, 2014). Akurasi sering diungkapkan sebagai persentase perbedaan dari nilai sebenarnya:

$$\text{Akurasi (\%)} = [(\text{rata-rata} - \text{nilai sebenarnya}) / \text{nilai sebenarnya}] \times 100$$

Akurasi juga dapat dinyatakan sebagai persentase rata-rata ke nilai sebenarnya:

$$\text{Akurasi (\%)} = (\text{rata-rata} / \text{nilai sebenarnya}) \times 100$$

(Bertholf & Winecker, 2007).

### BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Analisis Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana Bandung mulai dari bulan Maret-Juni tahun 2021. Alur dari penelitian meliputi 4 bagian utama yakni pemeriksaan bahan baku, optimasi sistem kromatografi, validasi metode dan penetapan kadar sulfametoksazol dan trimetoprim pada sediaan suspensi oral.

Jenis penelitian ini bersifat eksperimental, parameter penelitian yang diterapkan adalah optimasi sistem kromatografi yakni menggunakan metode KLT dengan menghitung nilai  $R_f$  pada rentang 0,2-0,8 dengan memvariasikan kombinasi dan komposisi fase gerak. Visualisasi bercak dilakukan di bawah Sinar UV<sub>254</sub> nm, selanjutnya bercaknya direkam/video menggunakan kamera digital dan akan di analisa dengan *software ImageJ* untuk menghasilkan nilai AUC. Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Parameter yang digunakan adalah selektivitas, sensitifitas (BD dan BK), linearitas, uji perolehan kembali (akurasi dan presisi), setelah semua parameter validasi memenuhi persyaratan, maka metode ini akan digunakan untuk menetapkan kadar sulfametoksazol dan trimetoprim dalam sediaan suspensi oral generik. Nilai hasil pengukuran menggunakan metode KLT Video desintometri akan dibandingkan dengan nilai yang tertera pada etiket yang akan dianalisis secara statistik (Muttaqin et al., 2016).