

PENGEMBANGAN METODE IDENTIFIKASI INDOMETASIN DENGAN
KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

A.A. Wahyudhie, I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, I M.A.G. Wirasuta

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Dr.rer.nat. I Made Agus Gelgel Wirasuta, M. Si., Apt.
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837
Email: mgelgell@yahoo.de

ABSTRAK

Indometasin adalah obat yang memiliki efek sebagai antiinflamasi. Berdasarkan efek tersebut, indometasin sering ditambahkan secara ilegal ke dalam produk obat herbal yang memiliki khasiat untuk menghilangkan pegal linu atau rematik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan suatu metode KLT-Spektrofotodensitometri yang digunakan untuk uji identifikasi dan menentukan validasinya yang meliputi linearitas, batas deteksi, spesifisitas, dan presisi.

Sampel diesktraksi menggunakan metode SPE C₈-Cation Exchange dan kemudian dipisahkan dengan dua sistem KLT yang berbeda yaitu sistem TF dan TE. Kromatogram dan spektrum dari masing-masing noda senyawa dibuat pada panjang gelombang 210 nm dan 190-400 nm dengan menggunakan TLC Scanner 3 (Camag-Muttenz-Switzerland). Senyawa diidentifikasi berdasarkan nilai hR_f^c dan spektrum in situ.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari uji identifikasi menunjukkan bahwa fraksi SPE mengandung indometasin. Nilai dari validasi metode yang dilakukan telah valid untuk linearitas dengan $r > 0,999$, batas deteksi untuk kedua sistem adalah 3,698 ng, spesifisitas metode dengan nilai korelasi spektrum $> 0,90$ untuk indometasin, dan presisi untuk hR_f dan AUC menghasilkan KV $< 2\%$.

Kata kunci: indometasin, identifikasi, SPE, KLT-Spektrofotodensitometri

1. PENDAHULUAN

Indometasin adalah obat yang memiliki efek sebagai antiinflamasi. Berdasarkan efek tersebut, indometasin sering ditambahkan secara ilegal ke dalam produk obat herbal yang memiliki khasiat untuk menghilangkan pegal linu atau rematik (BPOM RI, 2008).

Kontrol kualitas dari produk obat herbal merupakan tanggungjawab dari BPOM dimana salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan indometasin di dalam obat herbal adalah dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan metode yang sederhana, murah, dan handal (Flanagan et al., 2007) sehingga Wirasuta (2012) telah memanfaatkan KLT dalam analisis toksikologi forensik sebagai metode untuk uji konfirmasi senyawa narkotika dan psikotropika.

Indometasin merupakan salah satu obat NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) derivat indolilasetat. Mekanisme kerja dari indometasin adalah sebagai penghambat COX nonselektif yang poten sehingga dapat menurunkan pembentukan prekursor prostaglandin (Katzung, 2010). Pada penelitian ini dikembangkan suatu metode KLT-Spektrofotodensitometri yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa indometasin.

2. MATERI DAN METODE

2.1 Alat

Pipet ukur, labu ukur, gelas beaker, botol vial, pipet tetes, ballfiller, kertas saring, corong pisah, timbangan analitik (AND GR-200), Linomat 5 (Camag-Muttenz-Switzerland), bejana kromatograf (Camag-Muttenz-Switzerland), Spektrofotodensitometer TLC-Scanner 3 (Camag-

Mutenz-Switzerland), pH meter (Oakton), oven (Mettler), alat pengaduk mekanik (Ika vibrax VXR basic), pompa vakum (Gast), manifold (Phenomenex).

2.2 Bahan

Semua bahan kimia dan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro analisis (Merck-Germany) yaitu metanol, asam asetat, amonium hidroksida, n-heksana, diklorometana, isopropanol, kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), etil asetat, natrium hidroksida (NaOH), dan aquades. Senyawa standar indometasin (BPOM RI), kodein fosfat (BPOM RI), salbutamol sulfat (Ferron Par Pharmaceutical), difenhidramin HCl (BPOM RI), diazepam (BPOM RI), bromheksin (BPOM RI), klordiazepoksid (BPOM RI), natrium diklofenak (Ferron Par Pharmaceutical), kolom SPE Strata Screen C (Phenomenex), dan plat aluminium TLC Silika Gel 60 GF₂₅₄ (Merck-Germany).

2.3 Metode

2.3.1 Penyiapan Larutan

Larutan-larutan yang harus dibuat meliputi larutan baku stok indometasin 2 mg/mL, larutan standar pembanding indometasin dengan variasi konsentrasi sebesar 5, 50, 100 dan 500 $\mu\text{g/mL}$, larutan NaOH 0,2 M, larutan asam asetat 0,1 M, larutan dapar fosfat 0,1 M pH 6, fase gerak sistem TF (etilasetat) dan TE (etil asetat: metanol: ammonia (85:10:5 %v/v)), larutan standar senyawa referensi sistem TF (diazepam, klordiazepoksid, natrium diklofenak) dan sistem TE (kodein, salbutamol sulfat, bromheksin, difenhidramin HCl) dengan konsentrasi masing-masing senyawa dalam larutan sebesar 250 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.2 Ekstraksi Senyawa dengan Metode SPE

Pengkondisian kolom SPE dilakukan dengan mengikuti metode yang telah dikembangkan oleh Purbandika (2011). Sebelum dimasukkan ke dalam kolom SPE, sampel larutan senyawa standar indometasin konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 500 μL ditambahkan dengan 500 μL dapar fosfat 0,1 M pH 6. Campuran dikocok menggunakan pengaduk mekanik selama 30 menit. Proses ekstraksi sampel indometasin dilakukan seperti

metode yang dikembangkan oleh Purbandika (2011).

2.3.3 Sistem Pemisahan dengan KLT-Spektrofotodensitometri

Disiapkan plat KLT dengan ukuran 10 x 10 cm sebanyak 2 buah yang telah dicuci dengan metanol dan diaktivasi sebelumnya. Penotolan pada masing-masing plat dilakukan menggunakan Linomat 5 dengan lebar pita totalan sebesar 3 mm, jarak antar totalan 6 mm, dan totalan pertama 10 mm dari tepi kiri dan bawah plat. Fraksi hasil SPE dari 3 kali pengulangan ditotolkan pada totalan 1-3, senyawa standar referensi sistem pada totalan ke-4 dan larutan standar pembanding indometasin pada totalan 5-12. Salah satu plat elusi dengan fase gerak sistem TF (etilasetat) sedangkan plat lainnya elusi dengan fase gerak sistem TE (etil asetat: metanol: ammonia (85:10:5 %v/v)) sampai jarak pengembangan 8 cm dalam bejana kromatograf yang telah dijenuhkan sebelumnya selama 30 menit. Plat hasil elusi yang telah kering dipindai pada panjang gelombang 210 nm untuk membuat kromatogramnya dan spektrumnya dibuat pada panjang gelombang 190-400 nm lalu diuji kemurniannya.

2.3.4 Analisis Data

Koreksi nilai hR_f menjadi hR_f^c menggunakan metode poligonal mengacu pada De Zeeuw et al (1992) dengan modifikasi pada senyawa standar referensi sistem yang digunakan. Perhitungan nilai hR_f^c secara otomatis menggunakan metode poligonal dengan memanfaatkan WinCATS-Speclib-Tool (Camag -Switzerland) dilakukan dengan mengacu pada Wirasuta (2012).

Pemastian identitas puncak pada kromatogram dari fraksi hasil SPE dilakukan berdasarkan nilai hR_f^c analit \pm error window masing-masing sistem KLT (errow window TF = 8; TE = 11). Dilihat juga nilai korelasi (r) spektrum analit yang dibandingkan dengan spektrum standar pada library dimana nilai korelasi (r) minimum yang ditetapkan sebesar 0,80 (Wirasuta, 2012).

2.3.5 Uji Validasi Metode Analisis

Validasi metode yang dilakukan untuk analisis kualitatif meliputi penentuan linearitas, batas deteksi (LOD), spesifisitas, dan presisi (United Nations Office on Drugs and Crime, 2009).

A. Penentuan Linearitas, Batas Deteksi (LOD), dan Spesifisitas

Penentuan linearitas, batas deteksi (LOD), dan spesifisitas menggunakan plat dari hasil prosedur 2.3.3. Plat tersebut dipindai dengan Spektrofotodensitometer TLC-Scanner 3 (Camag-Mutenz-Switzerland) pada panjang gelombang maksimum indometasin yaitu 273 nm (Moffat et al., 2005) untuk membuat kromatogramnya dan setiap puncak noda yang ditemukan dalam kromatogram dipindai pada panjang gelombang 190-400 nm untuk dibuat spektrumnya. Linearitas dari masing-masing sistem KLT dilihat dari persamaan regresi linier dan koefisien korelasi (r) yang diperoleh, dimana nilai koefisien korelasi (r) yang ditetapkan $> 0,999$ (Lawson, 1996). Persamaan regresi yang diperoleh tersebut dimanfaatkan untuk menghitung nilai batas deteksi (LOD).

Penentuan spesifisitas ditentukan dengan melakukan uji kemurnian puncak (purity peaks) yang akan menghasilkan nilai koefisien korelasi spektrum (r) pada R_f awal dengan R_f maksimum ($r_{s,m}$) dan R_f maksimum dengan R_f akhir ($r_{m,e}$) dimana nilai koefisien korelasi spektrum (r) yang ditetapkan $> 0,999$ (Indrayanto, 2009).

B. Penentuan Presisi

Menurut Harmita (2004), penentuan presisi suatu metode analisis dilakukan dengan menggunakan 3 variasi konsentrasi larutan standar sebesar 80, 100, dan 120% yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Pada penentuan presisi dari metode yang dikembangkan ini, disiapkan plat KLT dengan ukuran 10 x 10 cm sebanyak 2 buah yang telah dicuci dengan metanol dan diaktivasi sebelumnya. Pada masing-masing plat ditotolkan larutan standar indometasin dengan variasi massa penotolan sebesar 400,500, dan 600 ng/totolan yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Plat selanjutnya dielusi menggunakan 2 sistem fase gerak seperti pada prosedur 2.3.3 dan dipindai dengan Spektrofotodensitometer TLC-Scanner 3 (Camag-Mutenz-Switzerland) seperti pada prosedur 2.3.5 (A). Presisi dilakukan terhadap parameter hR_f dan AUC senyawa indometasin pada sistem TF dan TE dengan persyaratan koefisien variasi (KV) yang diperoleh harus $< 2\%$ (Indrayanto, 2009).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji Identifikasi

Hasil pemisahan dengan KLT menggunakan 2 sistem fase gerak berbeda yaitu sistem TF dan TE yang berupa kromatogram dapat dilihat pada Gambar A.1 dan A.2 dengan nilai hR_f dari masing-masing senyawa standar referensi sistem dapat dilihat pada Tabel B.1.

Hasil dari koreksi nilai hR_f pada kromatogram fraksi hasil SPE dengan metode yang mengacu pada Wirasuta (2012) dan Hit Factor (HF) yang diperoleh dari puncak yang diduga indometasin pada sistem TF dan TE dapat dilihat pada Gambar A.3 dan A.4. Identifikasi dilakukan dengan melihat nilai hR_f^c dan korelasi spektrum analit dengan pustaka. Dari hasil identifikasi pada 2 sistem KLT, didapatkan hasil bahwa hanya senyawa indometasin yang berada dalam rentang $hR_f^c \pm \text{error window}$ dari kedua sistem KLT dengan korelasi spektrum $> 0,80$ yaitu 0,82887 pada sistem TF dan 0,99280 pada sistem TE sehingga dapat disimpulkan bahwa analit tersebut adalah senyawa indometasin.

3.2 Uji Validasi Metode Analisis

Berdasarkan dari uji validasi yang dilakukan, uji spesifisitas untuk senyawa indometasin dilihat dari hasil uji purity peaks (Tabel B.3) yang menunjukkan bahwa puncak yang diidentifikasi sebagai indometasin merupakan puncak murni karena memiliki nilai korelasi spektrum $> 0,999$. Persamaan regresi yang diperoleh: $y = 30,58x + 139,96$ dengan $r = 0,99999$ (sdv = 0,73%) untuk sistem TF dan $y = 24,02x + 85,57$ dengan $r = 0,99954$ (sdv = 4,50%) untuk sistem TE. Batas deteksi (LOD) yang diperoleh sebesar 3,698 ng. Hasil dari presisi yang dilakukan meliputi presisi hR_f dan AUC dapat dilihat pada Tabel B.4 dan B.5 dimana KV yang diperoleh $< 2\%$.

4. KESIMPULAN

Metode KLT-Spektrofotodensitometri yang dikembangkan dengan 2 sistem fase gerak berbeda yaitu sistem TF dan TE dapat digunakan untuk uji identifikasi indometasin dengan spesifisitas $r > 0,999$, linearitas dengan $r > 0,999$, batas deteksi (LOD) sebesar 3,698 ng, serta presisi hR_f dan AUC dengan koefisien variasi (KV) $< 2\%$.

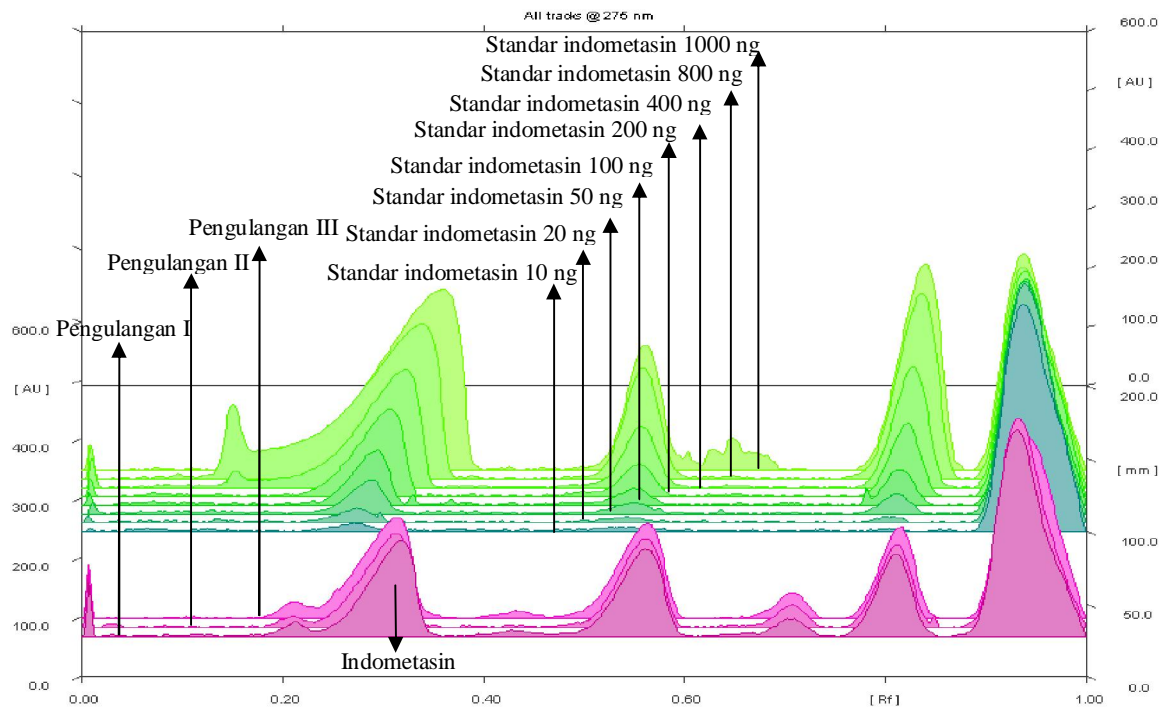
UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada reviewer Ibu Ni Made Pitri Susanti, S.Farm., M.Si., Apt., dan Ibu Luh Putu Mirah Kusuma Dewi, SF., Apt., Lembaga Forensik dan Sains Kriminologi Universitas Udayana Bali atas bantuan tempat, alat, dan bahan yang diberikan serta seluruh pihak yang telah memberikan doa dan dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian ini.

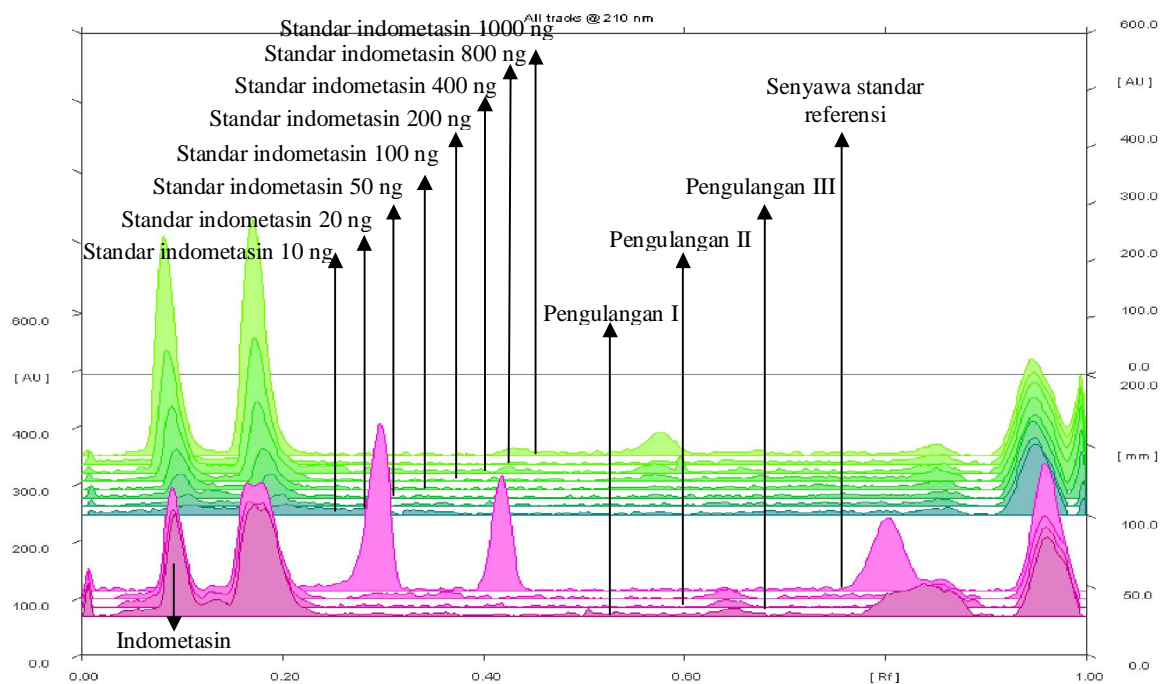
DAFTAR PUSTAKA

- Betram G. Katzung. (2010). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran (ECG). hal. 597-598.
- BPOM RI. (2008). *Metode Analisis PPOMN Tahun 2008*. Jakarta: Balai Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Camag. (1999). *Welcome to the CAMAG WinCats Tutorial: WinCats Planar Chromatography*. Switzerland: CAMAG.
- De Zeeuw, R. A., J. P. Franke., F. Degel., G. Machbert., H. Schutz., J. Wijbeek. (1992). *Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems*. Jerman: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Flanagan, R. J., A. Taylor., I. D. Watson, R. Whelpton. (2007). *Fundamentals of Analytical Toxicology*. New Delhi: John Wiley and Sons, Ltd. p. 131 – 134, 137 – 139.
- Harmita. (2004). *Petunjuk Cara Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian. vol. I No. 3. hal. 117-135.
- Indrayanto, G., M. Yuwono., Suciati. (2009). *TLC: Validation of Analyses*. J. Cazes, Ed. *Encyclopedia of Chromatography Third Edition*. p. 2336 - 2339. London: Informa Ltd.
- Lawson, Lary. (1996). *Guidance Memo No. 96-007: Evaluation of Calibration Curve Linearity*. Virginia: Department of Environmental Quality Water Operations Commonwealth of Virginia. p. 1-2.
- Moffat, C. A., M. D. Osselton., B. Widdop. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press. Elektronik Book.
- Purbandika, I M.D.M. (2011). *Metode Ekstraksi Fase Padat (Solid Phase Extraction) Untuk Narkotika dan Psicotropika dalam Urin*. Skripsi. Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. hal 44.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing og Illicit Drugs in Seized Material and Biological Specimens*. New York: United Nations. p. 8-13, 18-19.
- Wirasuta, I M.A.G. (2012). *Chemical Profiling of Ecstasy Recovered From Around Jakarta By High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Densitometry (In Press)*. *Egypt J Forensic Sci.* vol 2 (3). p. 97-104.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2012.05.002>.

APENDIKS A.

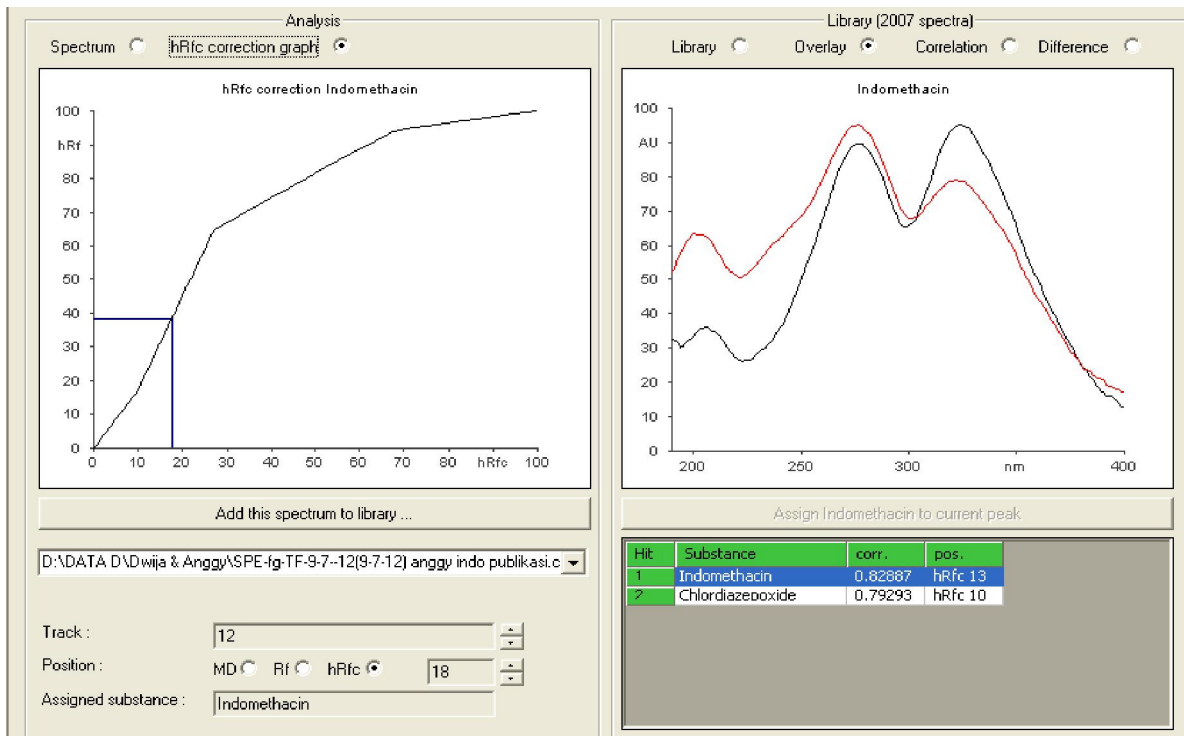


Gambar A.1. Kromatogram fraksi hasil SPE dan larutan standar pembanding indometasin yang dielusi dengan sistem TF

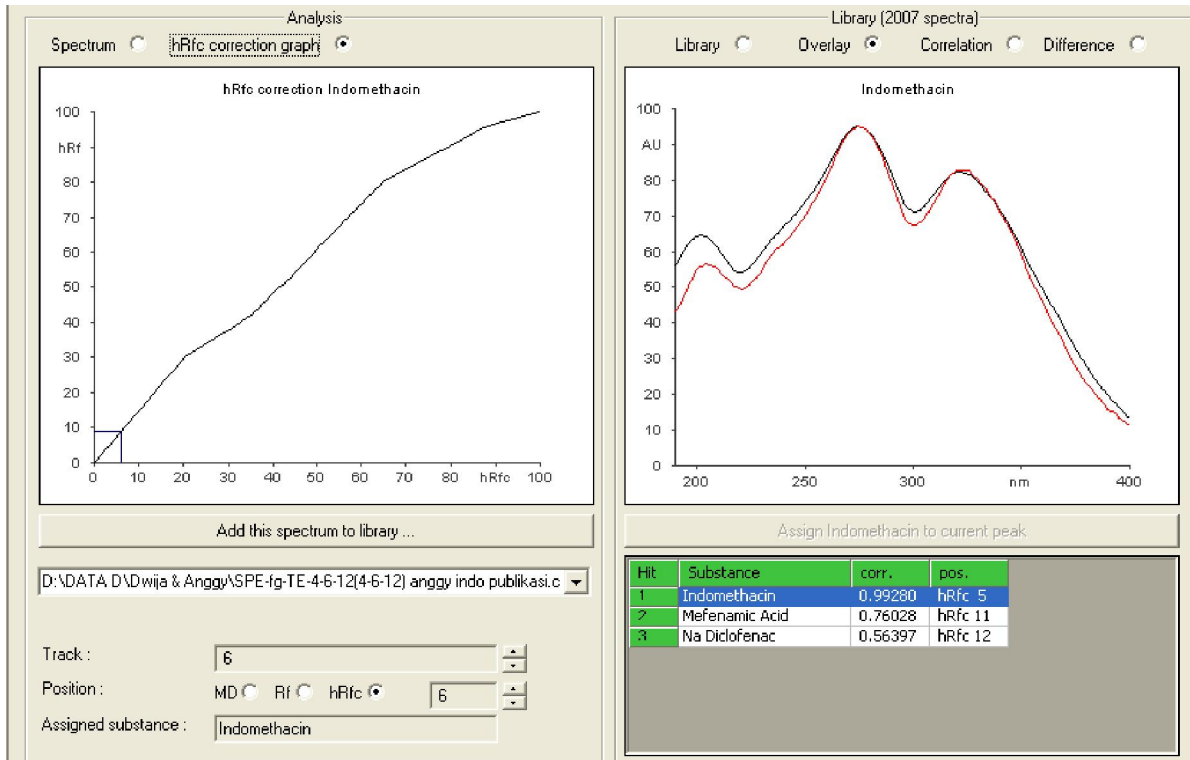


Gambar A.2. Kromatogram fraksi hasil SPE dan larutan standar pembanding indometasin yang dielusi dengan sistem TE

Pengembangan Metode Identifikasi Indometasin dengan KLT-Spektrofotodensitometri
(Wahyudhie, A.A., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

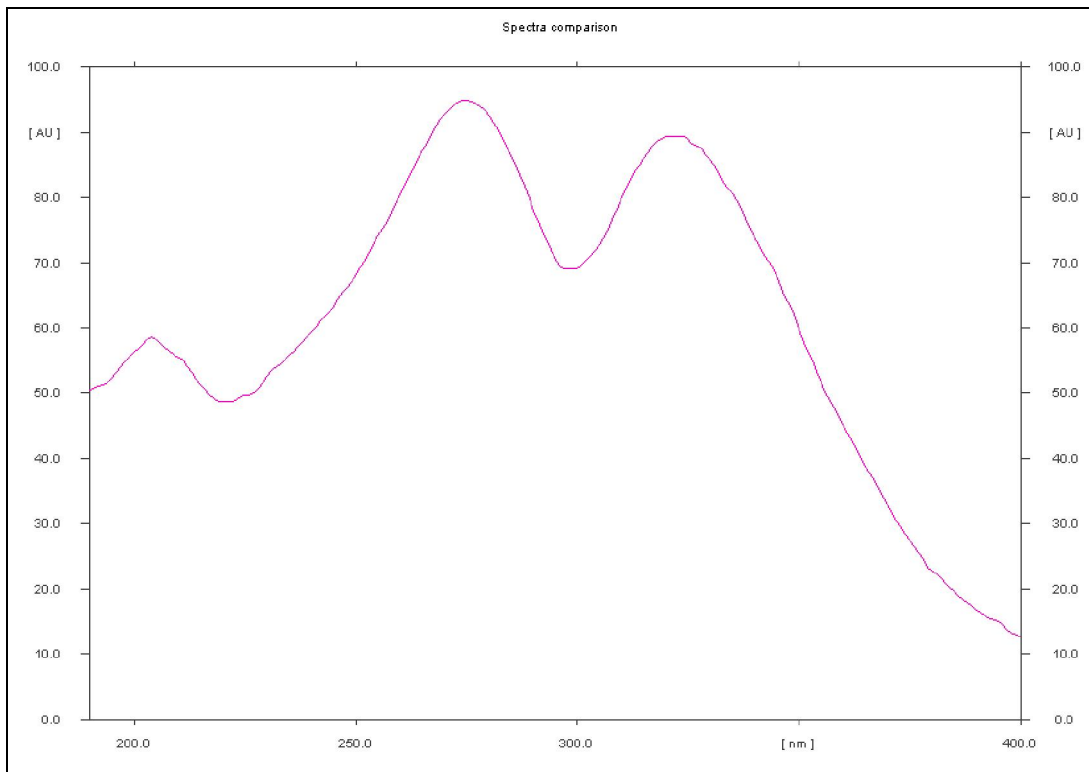


Gambar A.3. Hasil koreksi hR_f analit menggunakan metode poligonal beserta korelasi spektrum analit terhadap spektrum library pada sistem TF dengan program WinCATS

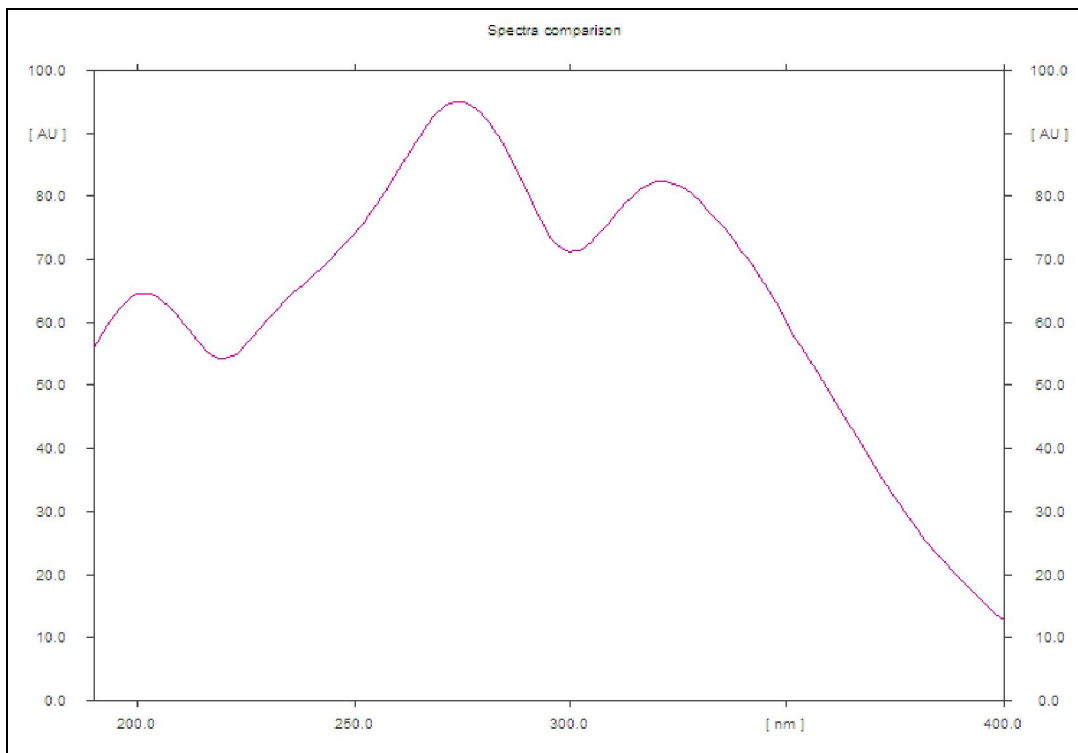


Gambar A.4. Hasil koreksi hR_f analit menggunakan metode poligonal beserta korelasi spektrum analit terhadap spektrum library pada sistem TE dengan program WinCATS

Pengembangan Metode Identifikasi Indometasin dengan KLT-Spektrofotodensitometri
(Wahyudhie, A.A., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)



Gambar A.5. Spektrum in situ analit pada sistem TF



Gambar A.6. Spektrum in situ analit pada sistem TE

Pengembangan Metode Identifikasi Indometasin dengan KLT-Spektrofotodensitometri
(Wahyudhie, A.A., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

APENDIKS B.

Tabel B.1 Nilai hR_f senyawa standar referensi pada sistem TF dan TE

Senyawa standar referensi	hR_f	hR_f^c pustaka
	Sistem TF	
Klordiazepoksid	17	10
Diklofenak	57	27
Diazepam	79	49
	Sistem TE	
Salbutamol	31	20
Kodein	42	35
Difenhidramin	80	65
Bromheksin	94	88

Tabel B.2 Hasil identifikasi puncak noda analit pada 2 sistem KLT

Pengulangan	hR_f^c analit	HF	Sistem TF			Sistem TE		
			Senyawa dengan kecocokan terbaik	Korelasi spektrum	hR_f^c analit	HF	Senyawa dengan kecocokan terbaik	Korelasi spektrum
I	38	1	Indometasin	0,81766	9	1	Indometasin	0,99121
II	38	1	Indometasin	0,82887	9	1	Indometasin	0,98937
III	39	1	Indometasin	0,82493	9	1	Indometasin	0,99280

Keterangan: hR_f^c = Harga hR_f terkoreksi; HF = Hit Factor

Tabel B.3 Nilai koefisien korelasi spektrum (r) dari hasil uji purity peaks

Pengulangan	Senyawa	Sistem TF			Sistem TE		
		r(s,m)	r(m,e)	Kemurnian	r(s,m)	r(m,e)	Kemurnian
I	Indometasin	0,999789	0,999611	ok	0,999762	0,999216	ok
II	Indometasin	0,999815	0,999805	ok	0,999309	0,999531	ok
III	Indometasin	0,999401	0,999437	ok	0,999898	0,999107	ok

Keterangan: r(s,m) = perbandingan korelasi spektrum R_f awal dengan R_f maksimum; r(m,e) = perbandingan korelasi spektrum R_f maksimum dengan R_f akhir

Tabel B.4 Presisi hR_f indometasin pada sistem TF dan TE

Sistem KLT	TF	TE
Rata-rata	62,444	8
SD	0,527	0
KV (%)	0,844	0

Keterangan: SD = Standar Deviasi; KV = Koefisien Variasi

Tabel B.5 Presisi AUC indometasin pada sistem TF dan TE

Massa Penotolan (ng)	400		500		600	
	Sistem TF	Sistem TE	Sistem TF	Sistem TE	Sistem TF	Sistem TE
Rata-rata	4735,4	6932,7	5828,7	8671,7	7224,1	9398,3
SD	53,586	31,341	24,660	107,572	58,902	42,962
KV (%)	1,132	0,452	0,423	1,240	0,815	0,457

Keterangan: SD = Standar Deviasi; KV = Koefisien Variasi