

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Asam asetil salisilat merupakan senyawa kimia yang dapat berfluoresensi dan dapat ditetapkan kadarnya dengan berbagai metode contohnya adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC/KCKT). Siswanto *et al.* (2016) telah berhasil menganalisis asam asetil salisilat dengan metode HPLC menggunakan asam benzoat sebagai standar internal, dengan kondisi kolom Purospher Star RP-18 Endcapped (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), fase gerak asetonitril : dapar fosfat 20 mM pH 2,5 (30:70 v/v), volume injeksi 20 µL, kecepatan alir 1,5 mL/menit, dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang UV 230 nm. Hasil dari penelitian validasi metode tersebut menunjukkan bahwa metode yang diusulkan memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dengan nilai LOQ (asam asetil salisilat = 0,024 µg/mL) dan LOD (asam asetil salisilat = 0,007 µg/mL) maka metode HPLC dapat dikatakan sesuai untuk dilakukannya penetapan kadar pada asam asetil salisilat.

Metode spektrofotometri UV juga pernah dilakukan untuk penetapan kadar asam asetil salisilat yang memenuhi parameter validasi suatu metode analisis dan terverifikasi. Kuntari *et al.* (2017) berhasil melakukan validasi metode secara spektrofotometri UV dengan nilai LOD dan LOQ adalah 0,9967 mg/L dan 0,0664 mg/L.

Metode spektrofotometri juga dapat ditentukan untuk penetapan kadar metoklopramid dan asam asetil salisilat. Elmansi *et al.* (2016) berhasil meneliti fluoresensi dari kedua obat tersebut sehingga diketahui linearitas dari asam asetil salisilat berada pada konsentrasi 0,01-0,1 mg/ml dengan nilai LOD sebesar 0,002 mg/ml dan LOQ sebesar 0,007 mg/ml serta pelarut yang digunakan dalam metode ini adalah metanol.

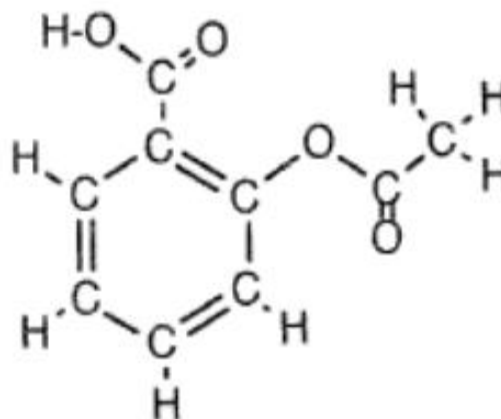
Selain itu, metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar asam asetil salisilat adalah metode kolorimetri. Lenggana (2010) menggunakan prinsip pembentukan kompleks warna ungu antara besi nitrat dengan gugus fenolik yang dibaca pada spektrofotometri UV-Visibel dan dihitung nilai

serapannya pada panjang gelombang maksimal 531 nm dan *operating time* 4 menit. Parameter validasi yang ditentukan adalah *repeatability*, presisi antara, akurasi, linearitas, *robustness*, LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantification*).

B. Landasan Teori

1. Asam Asetil Salisilat

Obat antiradang bukan steroid atau yang lazim dinamakan *non steroidal anti inflammatory drugs* (NSAIDs) atau anti-inflamasi non steroid (AINS) adalah golongan obat yang bekerja terutama di perifer yang berfungsi sebagai analgesik (peredam nyeri), antipiretik (penurun panas) dan anti-inflamasi (anti radang). Obat asam asetil salisilat ini mulai digunakan pertama kalinya untuk pengobatan simptomatis penyakit-penyakit rematik pada tahun 1899 sebagai obat antiradang bukan steroid sintetik dengan kerja antiradang yang kuat (Dannhardt & Laufer, 2000). Obat antiradang bukan steroid diindikasikan pada penyakit-penyakit rematik yang disertai radang seperti rheumatoid dan osteoarthritis untuk menekan reaksi peradangan dan meringankan nyeri (Dannhardt & Laufer, 2000).



Gambar 2.1 Struktur aspirin atau asam asetil salisilat (Kauffman, 2000)

Asam asetil salisilat yang lebih dikenal sebagai asetosal atau aspirin dapat berfluoresensi karena memiliki sistem ikatan rangkap terkonjugasi dan memiliki struktur yang planar dan kaku sehingga mampu

menyerap secara kuat di daerah 200-800 nm pada radiasi elektromagnetik. Sedangkan gugus fungsi yang dapat menghasilkan cahaya fluoresensi adalah senyawa yang memiliki gugus aromatis.

Asam asetil salisilat memiliki rumus molekul $C_9H_8O_4$ berbentuk kristal berwarna merah muda terang hingga kecokelatan yang memiliki berat molekul 180,16. Pemerian dari asam asetil salisilat adalah hablur putih, umumnya seperti jarum atau lempengan tersusun, atau serbuk hablur putih, tidak berbau atau berbau lemah, stabil di udara kering, di dalam udara lembab secara bertahap terhidrolisis menjadi asam salisilat dan asam asetat. Asam asetil salisilat memiliki kelarutan sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, larut dalam kloroform, dan dalam eter, agak sukar larut dalam eter mutlak (Dirjen POM, 1995).

Farmakokinetik dari asam asetil salisilat yaitu dapat mengabsorpsi dengan cepat, praktis dan lengkap terutama di bagian pertama duodenum. Namun, karena bersifat asam sebagian zat diserap pula di lambung. Aspirin diserap dalam bentuk utuh, dihidrolisis menjadi asam salisilat terutama dalam hati (Tjay & Rahardja, 2003).

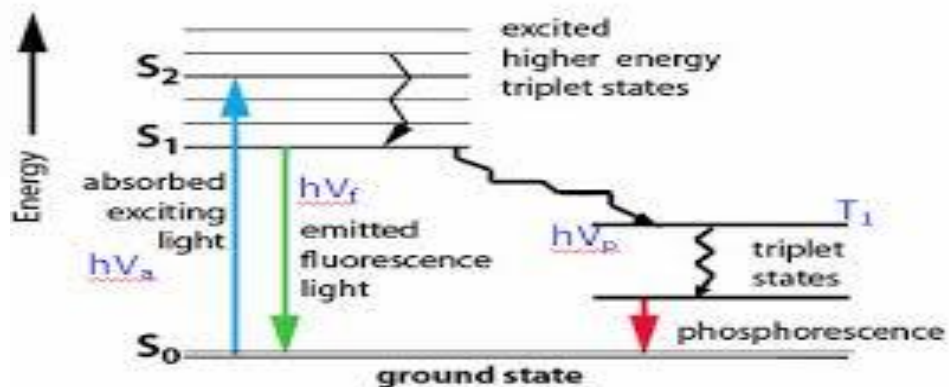
2. Spektrofluorometri

Spektroskopi fluoresensi merupakan metode spektroskopi yang mengamati intensitas atau spektrum fluoresensi sinar pada suatu zat yang dikenai cahaya. Spektroskopi fluoresensi yang menggunakan kamera CCD (*Charged Couples Devices*) atau CMOS (*Complementary Metallic Oxide Semiconductor*) sering disebut pencitraan fluoresensi (*Fluorescence Imaging*). Metode ini biasanya digunakan dalam biologi, kedokteran, bidang penelitian fisika dan kimia untuk berbagai tujuan. Fluoresensi merupakan salah satu proses yang terjadi ketika cahaya berinteraksi dengan suatu materi, dimana ketika atom atau partikel menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu akan memancarkan kembali cahaya dengan panjang gelombang yang lebih besar (Lemboumba, 2006). Fluoresensi terjadi karena adanya sifat dari partikel yang akan langsung memancarkan cahaya ketika memperoleh rangsangan cahaya dari luar,

namun pancaran tersebut akan hilang ketika rangsangan cahaya dari luar dihilangkan. Spektroskopi fluoresensi dapat diaplikasikan ke berbagai jenis sampel baik dalam bentuk larutan maupun padatan (Bharate & Bharate, 2012).

Apabila sampel berbentuk larutan maka pada umumnya cahaya yang akan diemisikan oleh suatu larutan yang dapat berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang 20 nm hingga 30 nm lebih panjang dari panjang gelombang radiasi eksitasi. Fluoresensi merupakan gejala dari suatu molekul setelah terjadinya radiasi cahaya, melepas kembali radiasi tadi dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Fluoresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak. Pada fluoresensi, pemancaran kembali sinar oleh suatu molekul yang telah menyerap energi sinar terjadi dalam waktu yang sangat singkat setelah penyerapan (10^{-8} detik). Jika penyinaran tiba-tiba dihentikan maka pemancaran kembali oleh molekul tersebut juga berhenti. Fluoresensi berasal dari transisi antara tingkat-tingkat energi elektronik singlet dalam suatu molekul (Bharate & Bharate, 2012).

Fluoresensi suatu molekul dikarakteristik oleh 2 spektrum yaitu spektrum eksitasi dan spektrum emisi. Untuk menghasilkan spektrum emisi maka pencarian panjang gelombang emisi dilakukan pada panjang gelombang eksitasi maksimum (Johnson & Stevenson, 1991).



Gambar 2.2 Proses fluoresensi dan fosforesensi (Haryanto, 2008)

Pada Gambar 2.2 menyatakan bahwa S adalah keadaan singlet dimana semua elektron dalam suatu molekul berpasangan, sedangkan T menyatakan keadaan triplet yaitu suatu keadaan yang mana dua elektron dengan spin yang tidak berpasangan. Tingkat dasar merupakan tingkat singlet. S₂ adalah suatu transisi elektron dari keadaan dasar (S₀) ke tingkat singlet secara eksitasi vibrasi. Setelah molekul mengalami transisi maka molekul akan mengemisikan energinya yang telah diabsorpsi selama transisi dari tingkat dasar (S₀) ke tingkat singlet (S₂). Penghamburan emisi tersebut akan terjadi dengan meradiasikan foton yang energinya sesuai dengan selisih tingkat eksitasi (S₂) dan tingkat dasar (S₀). Proses kompetisi relaksasi juga akan terjadi secara vibrasi yang meliputi perpindahan energi vibrasi ke molekul terdekat dan merupakan suatu proses cepat yang umumnya terjadi pada saat padat dan cair. Suatu proses dikatakan fluoresensi apabila emisi suatu foton sama nilainya dengan energi yang diserap oleh suatu molekul. Bila suatu molekul tereksitasi di dalam larutan, maka dengan cepat akan relaksasi ke tingkat vibrasi elektronik rendah, S₁. Konversi internal antara S₂ ke S₁ meliputi perbedaan energi yang kecil. Vibrasi relaksasi ke tingkat vibrasi terendah S₁ akan mendeaktivasikan molekul. Setelah mencapai tingkat ini, molekul dapat kembali ke tingkat dasar, misalkan dengan tingkat radiasi emisi. Pelepasan energi dengan radiasi ini dikenal sebagai fluoresensi (yaitu dari S₁ ke S₀). Panjang gelombang fluoresensi lebih besar daripada panjang gelombang absorpsinya (Bharate & Bharate, 2012).

Selain melakukan konversi dalam (*Internal Conversion*) dan fluoresensi, suatu molekul pada keadaan singlet (S₁) dapat melakukan penyilangan (konversi) antar sistem yang meliputi pembalikan spin elektron sehingga menempatkan molekul pada keadaan triplet (T₁). Setiap transisi dari tingkat triplet (T₁) ke keadaan dasar (S₀) merupakan fenomena pembalikan spin yang terlarang sehingga waktu hidup tingkat triplet lebih lama daripada relaksasi vibrasi yaitu sekitar 10⁻⁴ detik (Bharate & Bharate, 2012). Keseluruhan proses ini disebut dengan

fosforisensi. Spektrofluorometri memiliki banyak kelebihan di antaranya adalah:

1. Fluorometri lebih peka

Pada fluorometri pengukuran dilakukan secara langsung terhadap intensitas sinar fluoresen. Pengukuran langsung ini tanpa dilakukan perbandingan intensitas sinar semula (I_0). Hal ini dapat tercapai karena detektor pada fluorometri ditempatkan pada arah yang tegak lurus terhadap sinar pengekstasi. Kepekaan fluorometri dapat dipertinggi dengan cara memperbesar intensitas sinar pengekstasi atau dengan memperkuat (mengamplifikasi) sinar fluoresensi.

2. Fluorometri lebih sensitif

Hal ini karena hanya sedikit senyawa yang dapat memancarkan kembali sinar fluoresen atau fosforesen. Sementara itu pada proses absorpsi dapat dikatakan bahwa hampir semua senyawa organik mampu melakukannya.

3. Gangguan spektral dapat dikurangi

Pada fluorometri gangguan spektral dapat dikurangi dengan cara merubah panjang gelombang eksitasi atau emisi. Gangguan spektral adalah gangguan yang ditimbulkan oleh senyawa-senyawa lain yang melakukan penyerapan (absorpsi) dan emisi sinar fluoresen pada panjang gelombang sama dengan senyawa yang dianalisis.

a. Struktur Kimia dan Fluoresensi

Semakin besar penyerapan oleh suatu molekul maka semakin besar intensitas fluoresensinya. Senyawa dengan ikatan ganda terkonjugasi sangat menguntungkan untuk fluoresensi. Satu atau lebih kelompok penyumbang elektron seperti $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, dan $-\text{OCH}_3$ dapat meningkatkan fluoresensi. Senyawa polisiklik seperti vitamin K, purin, dan nukleosida dan poliena terkonjugasi seperti vitamin A yang dapat berfluoresensi. Gugus $-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, dan azo cenderung menghambat fluoresensi. Sifat substituen lain dapat mengubah derajat fluoresensi. Fluoresensi pada beberapa sangat bergantung pada pH karena hanya bentuk

terionisasi atau tidak terionisasinya yang mungkin bersifat fluoresen. Sebagai contoh fenol dan C_6H_5OH yang dapat berfluoresensi sedangkan anion seperti $C_6H_5O^-$ (Bharate & Bharate, 2012).

Jika senyawa tidak berfluoresensi, maka bisa dikonversi ke derivat fluoresensinya. Misalnya, steroid yang tidak berfluoresensi dapat diubah menjadi senyawa yang fluoresen oleh dehidrasi dengan konsentrasi asam sulfat pekat. Alkohol siklik diubah menjadi fenol. Demikian pula dalam golongan asam, seperti asam malat, dapat direaksikan dengan β -naftol dalam konsentrasi asam sulfat pekat untuk membentuk turunan fluoresensi. Antibodi dapat dibuat berpendar dengan cara mengkondensasikannya dengan isosianat fluoresensi, yang bereaksi dengan gugus amino bebas dari protein. NaDH mengurangi bentuk nikotinamida adenin dinukleotida, fluoresensinya sebagai dasar uji sensitif enzim dan substratnya. Kebanyakan asam amino tidak berpendar, tapi turunan fluoresennya terbentuk melalui reaksi dengan dansil klorida (Bharate & Bharate, 2012).

b. Hubungan Antara Konsentrasi dan Intensitas Fluoresensi

Hubungan antara konsentrasi dan intensitas fluoresensi dapat dengan mudah diturunkan dari hukum Beer bahwa intensitas fluoresensi (F) diberikan oleh:

$$F = \theta P_0(1-10^{-abc}) \quad (1)$$

Dimana θ merupakan hasil kuantum atau bilangan yang menyatakan antara jumlah molekul yang berfluoresensi terhadap jumlah total molekul yang tereksitasi. Besarnya quantum (θ) adalah: $0 \leq \theta \leq 1$. Nilai θ diharapkan mendekati 1, yang berarti efisiensi fluoresensi sangat tinggi. Persamaan ini sama dengan Hukum Beer. Hal ini terbukti dari persamaan, jika produk abc adalah besar, istilahnya adalah 10^{-abc} menjadi tidak berarti dibandingkan dengan 1, dan F menjadi konstan:

$$F = \theta P_0 \quad (2)$$

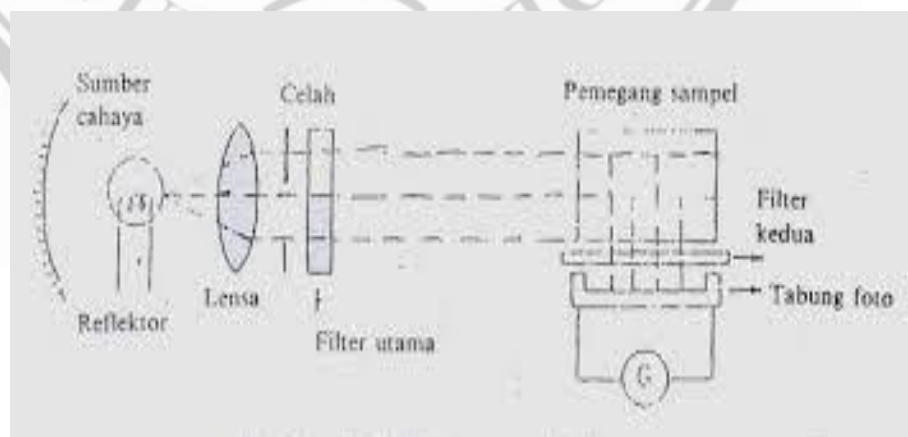
Di sisi lain, jika θ nilainya kecil (kurang dari 0,01), maka persamaan (2) dapat diperluas lagi sebagai aproksimasi yang baik.

$$F = 2.303\theta P_0 abc \quad (3)$$

Dengan demikian, untuk konsentrasi rendah, intensitas fluoresensi berbanding lurus dengan konsentrasi, juga sebanding dengan intensitas radiasi kejadian. Persamaan ini umumnya berlaku untuk beberapa konsentrasi hingga beberapa bagian per juta, tergantung pada substansinya. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, intensitas fluoresensi dapat menurun dengan meningkatnya konsentrasi. Alasannya bisa divisualisasikan intensitas tersebut (Bharate & Bharate, 2012).

c. Instrumentasi Spektrofluorometri

Menurut Depkes RI, (1995) pengukuran intensitas fluoresensi dapat dilakukan dalam suatu fluorometer filter sederhana. Instrumen ini terdiri dari sebuah sumber radiasi, sebuah filter primer, sebuah ruangan spesimen, sebuah sekunder, dan sebuah sistem deteksi fluoresensi.



Gambar 2.3 Diagram optik fluorometer (Mulja & Suharman, 1995)

Sumber sinar harus sangat intens dan sangat stabil karena intensitas fluoresensi berbanding langsung dengan I_0 . Lampu

merkuri dan lampu xenon merupakan sumber radiasi yang paling sering digunakan. Lampu-lampu ini mampu mengemisikan radiasi, baik pada daerah ultraviolet maupun daerah visibel. Emisi lampu xenon terdistribusi pada kisaran panjang gelombang yang luas, sementara itu emisi lampu merkuri memberikan intensitas yang sangat tinggi pada daerah panjang gelombang tertentu yaitu di daerah 254 nm dan 366 nm, sehingga sangat sesuai untuk radiasi eksitasi (Gandjar & Rohman, 2013).

Untuk memperoleh spesifisitas eksitasi dan sesatan sinar, maka dipilih pita radiasi yang sempit dari radiasi yang diemisikan oleh sumber sinar. Pemilihan ini dilakukan oleh penyarian eksitasi (*excitation filter*) yang mana pada kebanyakan fluorometer berupa penyaring kaca yang akan mentransmisikan sinar pada panjang gelombang yang dikehendaki dan akan menyerap semua radiasi yang lain. Penyaring-penyaring kaca akan mentransmisikan pita radiasi dengan lebar antara 50-100 nm. Penyaring-penyaring ini juga dapat saling ditukarkan/diganti sehingga kita bisa memilih penyaring yang mentransmisikan pita radiasi yang bersesuaian dengan absorbansi maksimal senyawa tertentu akan tetapi akan memotong sinar pada panjang gelombang yang lebih pendek atau lebih panjang. Penyaring eksitasi juga dikenal dengan penyaring utama (Gandjar & Rohman, 2013).

Sinar eksitasi selanjutnya melewati tempat sampel. Beberapa pelarut juga ada yang berfluoresensi sehingga harus dilakukan pemilihan secara cermat. Wadah sampel yang berasal dari gelas sudah cukup untuk analisis. Wadah sampel dari kuarsa harus digunakan pada panjang gelombang di bawah 320 nm (Gandjar & Rohman, 2013).

Sinar fluoresen tentu saja diemisikan ke segala arah oleh sampel. Pengukuran intensitas fluoresensi pada arah perambatan radiasi eksitasi sangatlah sulit karena melibatkan pengukuran sinar yang diemisikan terhadap sinar yang ditransmisikan oleh dasar

(*background*) yang mempunyai intensitas yang sangat tinggi. Masalah ini dapat diatasi dengan mengamati intensitas fluoresensi pada sudut kanan sinar eksitasi. Beberapa sinar yang ditransmisikan akan dihamburkan (*scattered*) dalam arah ini dan sinar yang tidak diharapkan ini akan dihilangkan dengan penyaringan fluoresensi kedua (penyaring sekunder) yang dipilih sedemikian rupa sehingga penyaring kedua ini akan mentransmisikan secara maksimal pada fluoresensi yang maksimal (Gandjar & Rohman, 2013).

Komponen-komponen alat spektrofotometer hampir sama dengan komponen-komponen pada spektrofotometer. Meskipun demikian ada perbedaan antar keduanya yakni bahwa pada spektrofotometer ada 2 monokromator, yaitu satu monokromator digunakan untuk panjang gelombang eksitasi dan yang lainnya digunakan untuk panjang gelombang emisi (Gandjar & Rohman, 2013).

3. Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut, memenuhi syarat untuk penggunaannya (Effendy, 2004). Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi (Harmita, 2008). Beberapa uji pada validasi metode analisis yaitu:

a. Uji linearitas

Uji linearitas dilakukan dari data pengukuran kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi linear sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linearitasnya. Tujuan linearitas yaitu untuk mengetahui seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dan konsentrasi (x). Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dari persamaan

regresi $y = a + bx$. Nilai linearitas yang baik adalah $0,99 \leq r \leq 1$ (Gandjar & Rohman, 2013).

b. Uji Presisi

Tujuan dilakukan presisi yaitu untuk mengetahui kedekatan hasil analisis apabila dilakukan oleh analis yang sama dengan waktu yang berbeda. Presisi dinyatakan dengan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi.

$$\text{RSD} = \frac{SD}{x} \times 100\%. \text{ Relative standard deviation/RSD}$$

dinyatakan memenuhi validasi metode jika nilai RSD antara 1 - 2% (Gandjar & Rohman, 2013).

c. Uji Akurasi

Tujuan dilakukan akurasi yaitu untuk mengetahui bahwa metode analisis mempunyai derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali.

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{CF-CA}{C*A} \times 100$$

CF : konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

CA : konsentrasi sampel sebenarnya

C*A : konsentrasi analit yang ditambahkan

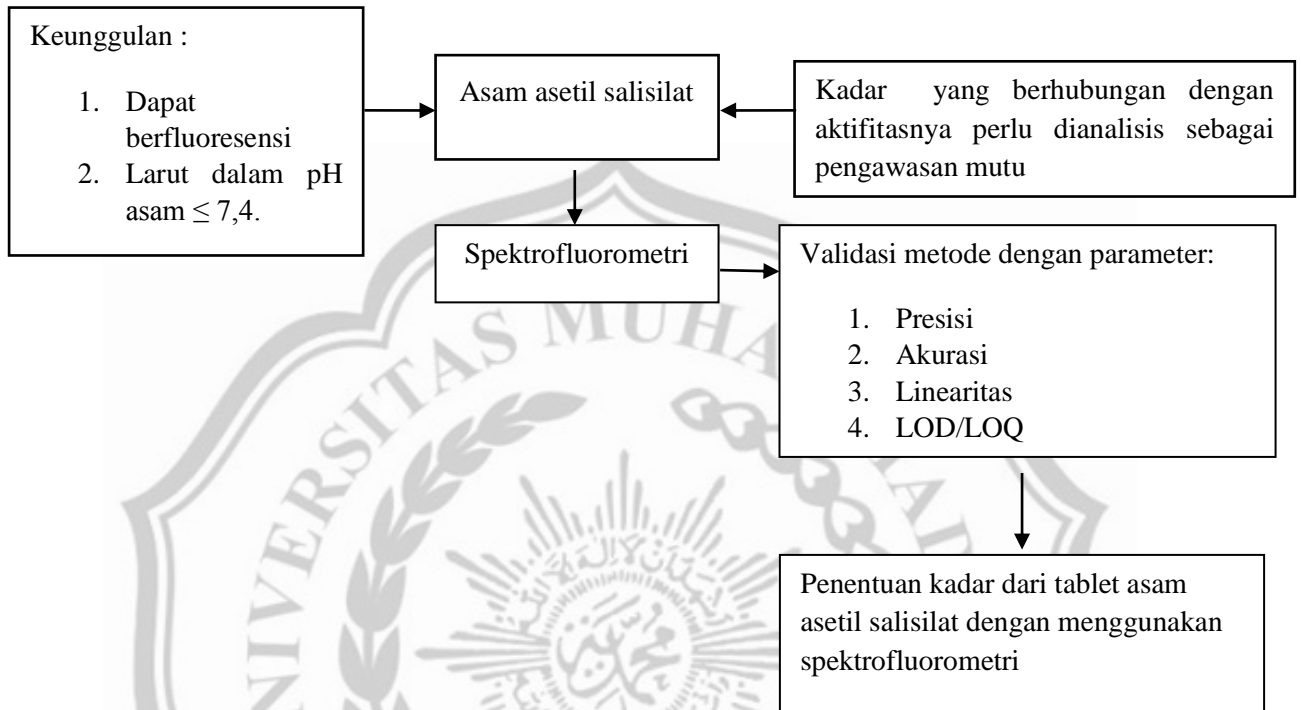
Metode validasi memenuhi syarat jika persen perolehan kembalinya dengan nilai rentang 80 - 120% (Gandjar & Rohman, 2013). Simpangan baku relatif (RSD) dinyatakan memenuhi validasi metode jika nilai RSD antara 1 - 2% (Gandjar & Rohman, 2013).

d. Uji LOD dan LOQ

LOD dan LOQ ditentukan dari kurva baku yang diperoleh. Tujuan penentuan batas deteksi yaitu untuk mengetahui jumlah terkecil analit yang masih bisa dideteksi namun tidak perlu dapat terukur dan tujuan penentuan batas kuantitasi yaitu untuk mengetahui jumlah terkecil analit yang masih bisa diukur dengan akurat (Gandjar & Rohman, 2013).

C. Kerangka Konsep

Kerangka konseptual pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.4 dibawah :



Gambar 2.4 Kerangka konsep penelitian validasi metode asam asetil salisilat dalam sediaan tablet merk menggunakan metode spektrofluorometri.

D. Hipotesis

Elmansi (2016) mengatakan bahwa penentuan asam asetil salisilat dapat dilakukan dengan metode spektrofluorometri karena metode ini sederhana, sensitif dan cepat. Dari hasil ini dapat ditarik kesimpulan bahwa metode spektrofluorometri dapat dijadikan untuk menetapkan kadar asam asetil salisilat.