

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Penelitian Terdahulu

Parasetamol dan ibuprofen telah berhasil ditetapkan kadarnya dengan beberapa metode. Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) telah dilakukan oleh Damayanti *et al.* (2003) untuk menentukan kadar parasetamol dan ibuprofen dengan fase gerak asetonitril-dapar fosfat 0,05 M, pH 4,5 dengan perbandingan 75:25 dengan penambahan natrium heksan sulfonat 0,075%, laju alir 0,5 mL/menit dan panjang gelombang deteksi 215 nm, waktu retensi parasetamol 4,89 menit dan ibuprofen 7,11 menit, kadar yang diperoleh dari parasetamol dan ibuprofen memenuhi persyaratan kadar 90-110% yaitu parasetamol 107,00% dan ibuprofen 104,76%. Selain itu, metode KCKT juga dilakukan oleh Narwade (2014) untuk menentukan kadar parasetamol, menggunakan kolom *stainless still* 20 cm x 4,6 mm yang dikemas dengan *octadesilsilane* terikat berpori silika 10 µm, laju aliran 0,2 mL/menit, injektor 20 µL, dan ditetapkan pada spektrofotometer 272 nm. Hasil kadar yang diperoleh 102,86%, sudah sesuai dengan Farmakope India. Altun (2002) telah berhasil juga dalam menganalisis parasetamol, kofein, dan dipyrone, menggunakan kolom C₈, elusi isokratik, laju alir 1,0 mL/menit, fase gerak 0,01 M KH₂PO₄-methanol-asetonitril-isopropil alkohol (420:20:30:30) (v/v/v/v), diukur dengan spektrofotometer pada 215 nm. Adipranoto (2010) juga telah berhasil menetapkan kadar parasetamol dan ibuprofen dengan KCKT fase terbalik, dengan fase diam kolom C₁₈, fase gerak metanol-aquabidest (90:10, pH 4,0), kecepatan alir 1,5 mL/menit, detektor UV 230 nm. Hasil kadar parasetamol 350,412-371,495 mg/tablet dan ibuprofen 195,978-203,428 mg/tablet, telah sesuai dengan persyaratan tablet 90-110% dari yang tertera di label.

Metode spektroskopi telah banyak dilakukan untuk menetapkan kadar parasetamol dan ibuprofen. Harshini *et al.* (2014) telah melakukan validasi dengan metode spektrofotometri UV pada parasetamol dan ibuprofen menggunakan panjang gelombang masing-masing 240 nm dan 220 nm dengan pelarut etanol. Selain itu, Aktas dan Kitis (2014), menetapkan kadar parasetamol dan kafein dengan metode spektrofotometri UV dan kombinasi PCR-PLS (*principal component regression-partial least square*) kemometrik. Metode spektrofotometri juga telah dilakukan oleh Luna dan Pinho (2014) untuk penentuan kadar parasetamol dan ibuprofen dalam tablet dan urin yang dikombinasikan dengan kemometrik.

Metode spektroskopi FTIR dapat dilakukan untuk menetapkan kadar parasetamol dan ibuprofen secara simultan yang telah dilakukan oleh Mallah *et al.* (2012) menggunakan FTIR transmisi kombinasi kemometrik (PLS) dengan teknik sampling pelet KBr yang mengandung standar dan sampel untuk akuisisi spektrum FTIR. Kalibrasi PLS pada daerah spektral 1781-1683 cm^{-1} untuk ibuprofen dan 1630-1530 cm^{-1} untuk parasetamol. Nilai koefisien determinasi (R^2) diperoleh 0,999 untuk ibuprofen dan 0,9998 untuk parasetamol. Akurasi dari model kalibrasi diverifikasi melalui *root mean square error of cross validation* (RMSECV) yaitu sebesar 0,064. Metode ini sudah jelas menunjukkan kemampuan spektroskopi FTIR transmisi untuk menetapkan penilaian kuantitas yang tepat dari zat aktif dalam sediaan farmasi, untuk kontrol kualitas produk dalam industri farmasi tanpa melibatkan banyak pelarut. Khaskheli *et al.* (2012), juga berhasil menerapkan metode spektroskopi FTIR transmisi dan PLS untuk menganalisis ibuprofen dalam tablet dan urin. Menurut Khaskheli *et al.* (2012) metode tersebut dapat dilakukan untuk estimasi ibuprofen dalam tablet formulasi dan urin secara cepat, dapat diandalkan, dan ekonomis. Penelitian oleh Mallah *et al.* (2013), parasetamol dalam sediaan formulasi padat juga dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan spektroskopi transmisi FTIR dan kemometrik PLS & *simple Beer's law* dalam daerah spektral 1800-1000 cm^{-1} . Hasil koefisien regresi (R^2) adalah 0,999; LOD 0,005 mg/g; dan LOQ 0,018 mg/g. Dalam uji gangguan, untuk memeriksa efek eksipien menunjukkan bahwa tidak ada gangguan yang

signifikan dari matriks sampel. Hasil tersebut menunjukkan sensitivitas dari FTIR transmisi untuk analisis farmasi. Metode ini dikembangkan untuk kuantifikasi parasetamol secara langsung, cepat, murah, tanpa pelarut (*green method*).

Teknik ATR-FTIR telah dilakukan oleh Calvo *et al.* (2015), yang digabungkan ke PCA (*Principal Component Analysis*) menunjukkan bahwa teknik tersebut mudah dan dapat diandalkan sebagai alternatif yang berguna untuk klasifikasi dan menetapkan identitas polimorfik obat pada kompleks campuran. Pada penelitian lain yang telah dilakukan oleh Hassib *et al.* (2017), bahwa metode kuantitatif ATR-FTIR ini tepat dan akurat, dengan persiapan sampel yang minimal dapat direalisasikan untuk penentuan empat obat NSAID dan juga berhasil ditentukan secara bersamaan antara produk degradasi dengan obat intinya. Metode ini dapat menjadi alternatif bagi sampel cair yang tidak dimurnikan tanpa perlu teknik pemisahan terlebih dahulu, sehingga lebih ekonomis dan mengurangi limbah kimia. Selain itu, penelitian oleh Rafi *et al.* (2016), metode FTIR-ATR kombinasi kemometrik telah berhasil direalisasikan untuk identifikasi dan diskriminasi rambut babi, kambing dan sapi. Penelitian oleh Winingsih *et al.* (2016), menggunakan FTIR-ATR ZnSe untuk penetapan kadar kuersetin dalam teh hitam. Sampel sebanyak 50 gram teh diekstraksi dengan pelarut 200 ml etanol 96%, lalu diuapkan, dan dikeringkan sampai terbentuk serbuk halus. Kemudian, pengujian dilakukan menggunakan FTIR-ATR ZnSe. Menurut Winingsih *et al.* (2016), ATR merupakan teknik yang cepat dan hanya perlu sampel yang sedikit, serta dapat mengukur sampel dalam bentuk padat dan cairan. Analisis kuantitatif dilakukan pada bilangan gelombang 1508-1513 cm^{-1} yang merupakan nilai serapan gugus C=C pada kuersetin. Analisis kuersetin dengan metode FTIR-ATR ZnSe menunjukkan kinerja analitik yang baik dengan akurasi dan presisi memenuhi standar validasi.

Penelitian ini dilakukan untuk menetapkan kadar parasetamol dan ibuprofen dalam tablet kombinasi secara simultan. Sampel yang akan dianalisis mengambil dari sampel merek X, Y, Z dari apotek di wilayah Purwokerto.

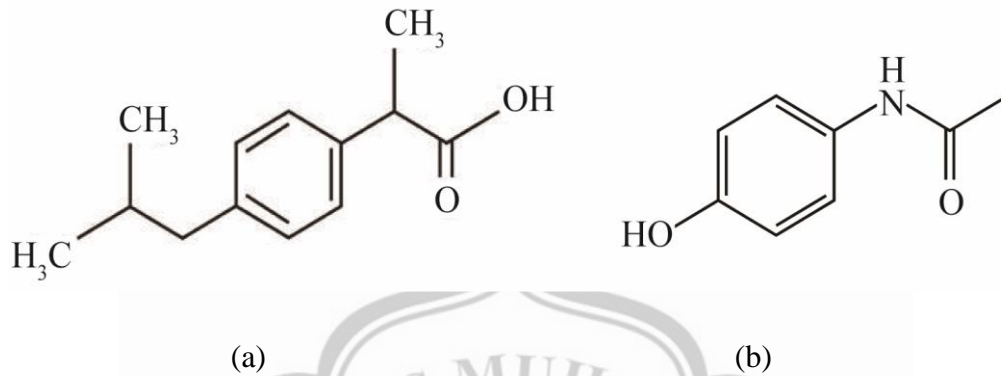
Metode yang digunakan adalah spektrofotometri FTIR dengan sel ATR yang dikombinasi dengan kemometrik PCA dan PLS.

B. Parasetamol dan Ibuprofen

Asetaminofen atau *N*-asetil-*p*-aminofenol atau yang lebih dikenal dengan parasetamol adalah metabolit aktif dari fenasetin yang biasa digunakan untuk antipiretik, antinyeri atau analgesik. Mengobati nyeri ringan sampai nyeri sedang, diantaranya sakit kepala, mialgia, maupun nyeri pasca melahirkan, dengan mekanisme penghambatan pada proses pembentukan COX-1 dan COX-2 di jaringan perifer (Katzung *et al.*, 2013). Parasetamol memiliki efek mirip dengan asetosal atau aspirin, namun tidak memiliki efek antiinflamasi seperti aspirin. Parasetamol kurang mengiritasi lambung dibanding asetosal sehingga lebih disukai khususnya pada orang lansia (BPOM RI, 2008). Pada kasus nyeri ringan, parasetamol akan dipilih pada pasien dengan alergi aspirin atau pasien yang kurang dapat mentoleransi salisilat. Selain itu, parasetamol juga biasa digunakan sebagai antipiretik untuk mengatasi demam, namun obat ini tidak memiliki efek antiinflamasi, misalnya pada penyakit arthritis rheumatoid, walaupun parasetamol dapat digunakan sebagai terapi adjuvan terhadap terapi inflamasi (Katzung *et al.*, 2013). Dosis oral untuk dewasa umumnya 0,5-1 gram setiap 4-6 jam dengan dosis maksimum 4 gram perhari. Pada anak-anak dosis dapat diulangi 4-6 jam jika diperlukan dengan dosis maksimum 4 kali dosis dalam 24 jam, umur 2 bulan yaitu 60 mg pasca imunisasi pileksia; dibawah umur 3 bulan (dengan saran dokter) 10 mg/kgbb (5mg/kgbb jika *jaundice*); umur 3 bulan–1 tahun dosis yang diberikan 60-120 mg; umur 1-5 tahun dosis yang diberikan 120-250 mg; 6-12 tahun 250-500mg (BPOM RI, 2008).

Menurut Farmakope Indonesia edisi V (Depkes RI, 2014), *acetaminophen* atau parasetamol atau *4'*-Hidroksiasetanilida, dengan rumus molekul $C_8H_9NO_2$, memiliki bobot molekul 151,16 gram/mol, dan struktur kimia pada gambar 2.1. Parasetamol mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0% $C_8H_9NO_2$, dihitung terhadap zat anhidrat. Tablet parasetamol mengandung parasetamol, $C_8H_9NO_2$, tidak kurang dari 90,0% dan

tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Pemerian parasetamol yaitu berbentuk serbuk hablur; putih; tidak memiliki bau; rasa sedikit pahit. Kelarutannya yaitu larut dalam air mendidih dan dalam *natrium hidroksida* 1 N; mudah larut dalam etanol.



Gambar 2.1 Struktur kimia (a) ibuprofen dan (b) parasetamol (Depkes RI, 2014)

Ibuprofen adalah golongan obat NSAID (*non steroid anti inflammation drugs*) yang merupakan turunan sederhana asam fenilpropionat yang memiliki efek analgesik dan antiinflamasi (Katzung *et al.*, 2013). Ibuprofen termasuk dalam NSAID non selektif dengan mekanisme kerja ibuprofen adalah inhibitor isoenzim COX-1 dan COX-2 sehingga proses perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin terganggu. Prostaglandin merupakan molekul pembawa pada proses inflamasi atau peradangan. Dengan demikian, jika prostaglandin tidak diproduksi maka proses inflamasi akan berkurang (Wilmana dan Sulistia, 2007). Pada dosis 2400 mg/hari, ibuprofen memiliki efek yang sama dengan aspirin 4 g sebagai antiinflamasi. Pada dosis rendah yaitu <2400 mg sering diresepkan sebagai analgesik tetapi efek antiinflamasinya rendah. Biasanya dalam dosis rendah ibuprofen terdapat dalam beberapa produk merek (Katzung *et al.*, 2013). Beberapa nama dagang di Indonesia dengan komposisi parasetamol 350 mg dan ibuprofen 200 mg diantaranya yaitu Oskadon SP (Supra Ferbindo Farma), Neo Rheumacyl (Temposcan Pacific), Bimacyl (Bima Mitra Farma) (Ikatan Apoteker Indonesia, 2016).

Ibuprofen atau (\pm) -2-(*p*-Isobutilfenil) asam propionat, dengan rumus molekul $C_{13}H_{18}O_2$, memiliki berat molekul 206,28 gram/mol, dan struktur

kimia pada gambar 2.1. Ibuprofen mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% $C_{13}H_{18}O_2$ dihitung terhadap zat anhidrat. Pemerian ibuprofen yaitu berbentuk serbuk hablur, putih hingga hampir putih; berbau khas lemah. Kelarutan ibuprofen sangat mudah larut dalam etanol, metanol, aseton dan kloroform; sukar larut dalam etil asetat; praktis tidak larut dalam air. Tablet ibuprofen mengandung ibuprofen, $C_{13}H_{18}O_2$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket (Depkes RI, 2014).

Obat parasetamol dan ibuprofen sudah dapat ditemukan dalam bentuk kombinasi, sehingga pasien memiliki banyak pilihan obat untuk terapi. Salah satunya dimaksudkan untuk mencapai efek terapi yang lebih baik serta mengurangi efek samping. Pada studi yang dilakukan oleh Wong *et al.* (2014), menunjukkan kesimpulan bahwa ada beberapa bukti terapi antipiretik kombinasi dapat menjadi lebih efektif dalam menurunkan suhu daripada monoterapi saja. Menurut Nagrani dan Prayitno (2015), perbandingan efektivitas antara terapi kombinasi dan tunggal telah terbukti dapat menurunkan demam lebih cepat dan lebih lama. Dari segi keamanan, penelitian yang dilakukan oleh Tiffany (2015) menunjukkan hasil bahwa jumlah sel nekrosis hepar tikus pada kelompok pemberian parasetamol, ibuprofen, kombinasi parasetamol-ibuprofen adalah 65, 36, 54. Hal ini menunjukkan bahwa, penggunaan kombinasi parasetamol-ibuprofen lebih aman dibanding parasetamol tunggal yang dibuktikan dengan jumlah efek kerusakan pada sel-sel hati (nekrosis) yang lebih rendah dibandingkan penggunaan parasetamol tunggal. Penggunaan kombinasi parasetamol-ibuprofen pada dosis terapi secara berulang tidak boleh terlepas dari kesesuaian indikasi dan mempertimbangkan efek samping, khususnya pada pasien anak-anak yang harus diberikan secara hati-hati (Jurnalis *et al.*, 2015).

C. Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*)

Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) atau spektroskopi inframerah adalah suatu metode analisis berdasarkan pada prinsip interaksi suatu senyawa kimia dengan radiasi elektromagnetik yang akan menghasilkan suatu getaran (vibrasi) dari suatu ikatan kimia poliatomik atau gugus fungsional senyawa kimia. Teknik ini disebut juga dengan spektroskopi vibrasional (Moros *et al.*, 2010). Terdapat dua jenis spektrofotometer IR, yaitu spektrofotometer dispersif dan spektrofotometer FTIR. Kedua jenis spektrofotometer tersebut, dapat menghasilkan spektra yang identik, namun spektrofotometer FTIR mampu menghasilkan perolehan spektra IR lebih cepat dibandingkan spektrofotometer dispersif. Prinsip dasar spektroskopi FTIR yakni adanya interaksi radiasi antara dua berkas sinar untuk menghasilkan suatu interferogram yang merupakan sinyal yang dihasilkan sebagai fungsi perubahan *pathlength* antara 2 berkas sinar. Dua domain (jarak dan frekuensi) dapat ditukarbalikkan dengan matematis yang disebut dengan transformasi fourier (Rohman, 2014).

Terdapat 3 jenis spektroskopi vibrasional yang diaplikasikan luas dalam bidang farmasi yaitu spektroskopi inframerah dekat (*near infrared*), spektroskopi inframerah tengah (*mid infrared*), dan spektroskopi Raman. Daerah yang penting untuk analisis kualitatif sistem organik adalah IR tengah, karena banyak ditemukan vibrasi dasar (Rohman, 2014). IR tengah yang umumnya banyak digunakan untuk sebagian besar analisis kuantitatif yaitu pada rentang bilangan gelombang 4000-670 cm^{-1} (Rakesh *et al.*, 2014). Daerah spektra Raman adalah sama dengan IR tengah. Pada daerah IR dekat umumnya digunakan untuk konfirmasi struktur kimia, dan pada IR jauh penggunaannya sangat terbatas (Rohman, 2014). Rentang daerah inframerah dapat dilihat pada tabel 2.1. Ketiga teknik dan instrumen dalam metode tersebut merupakan teknik yang menarik dan menjanjikan untuk digunakan sebagai penelitian, untuk penjaminan mutu produk, dan merupakan teknik analisis kimia hijau karena hanya sedikit atau sama sekali tidak menggunakan pelarut atau reagen

kimia sehingga dapat mencegah bahaya yang dapat timbul karena reagen kimia atau pelarut dan mengurangi biaya analisis (Moros *et al.*, 2010).

Keuntungan utama teknik FTIR tersebut adalah luasnya interval bilangan gelombang yang dapat dijangkau oleh radiasi inframerah serta tingginya resolusi dan karakteristik pemindaian (*scanning*) yang cepat oleh instrumen modern. Selain itu, teknik ini bersifat non destruktif (tidak merusak), artinya sampel yang telah dianalisis dengan spektrofotometer FTIR dapat dianalisis dengan metode analisis lain. Disamping itu, teknik FTIR dapat memberikan hasil dengan cepat, bahkan dapat dilakukan tanpa praperlakuan sampel yaitu tanpa harus memerlukan tahapan-tahapan penanganan sampel, seperti pada teknik kromatografi yang melibatkan prosedur penyiapan sampel yang panjang (Rohman, 2014).

Tabel 2.1 Rentang Daerah Inframerah

Rentang	Inframerah Dekat	Inframerah Tengah	Inframerah Jauh
Panjang gelombang	0,8-2,5 μm	2,5-50 μm	50-1000 μm
Bilangan gelombang	12500-4000 cm^{-1}	4000-200 cm^{-1}	200-10 cm^{-1}
Energi	1,55-0,5 eV	0,5-0,025 eV	0,025-0,0012 eV
Frekuensi	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$ Hz	$1,2 \times 10^{14}$ - 6×10^{12} Hz	6×10^{12} - 3×10^{11} Hz
Aplikasi	Analisis kuantitatif, identifikasi gugus fungsional	Analisis kuantitatif, deteksi senyawa pengganggu	Analisis struktur molekul

Sumber: Watson, 2009; Rakesh, 2014

Teknik spektroskopi FTIR akan menghasilkan spektrum yang memiliki beberapa sifat sebagai berikut (Rohman, 2014), (1) spesifik terhadap suatu molekul, yaitu spektrum akan memberikan informasi yang menyatu (inheren) tentang gugus fungsional dari suatu molekul tersebut, termasuk jenis dan interaksi-interaksinya; (2) sidik jari (*fingerprint*), yaitu dapat menghasilkan spektrum yang khas dari suatu senyawa, yang mana tiap-tiap sampel yang berbeda akan mempunyai spektrum IR yang berbeda. Perbedaan tersebut dapat diketahui dari jumlah puncak, intensitas, atau bilangan gelombang eksak tiap-tiap puncak; (3) kuantitatif, yang mana intensitas puncak berkorelasi dengan konsentrasi; (4) non destruktif (tidak merusak), artinya pada jenis penanganan sampel tertentu seperti dengan *Attenuated Total Reflectance* (ATR), sampel yang telah dianalisis oleh spektrofotometer FTIR tidak rusak sehingga dapat dianalisis menggunakan metode analisis lain; (5) bersifat universal dalam pengambilan sampel dapat dengan sampel padat, cair, gas, sampel antara padat dan cair atau gas. Jadi, teknik FTIR dapat menganalisis berbagai jenis sampel, baik sampel padatan maupun sampel cairan (Jaswir, 2003).

Spektrum IR tengah dapat dibagi menjadi 4 daerah dan sifat frekuensi gugus secara umum dapat ditentukan dengan daerah-daerah serapan dimana gugus-gugus terdapat di dalamnya. Daerah tersebut adalah: (1) daerah ulur X-H ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$), X berupa O, N, ataupun C; (2) daerah rangkap tiga ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$); (3) daerah ikatan rangkap dua ($2000-1500\text{ cm}^{-1}$); (4) daerah sidik jari ($1500-600\text{ cm}^{-1}$) (Rohman, 2014). Tabel 2.2 merupakan tabel korelasi yang menyatakan hubungan antara bilangan gelombang atau frekuensi (cm^{-1}) dengan gugus fungsi pada penyerapan radiasi IR.

Radiasi IR akan dilewatkan melalui suatu cermin dan akan diteruskan mengenai senyawa analit lalu senyawa akan menyerap radiasi IR yang mengakibatkan molekul mengalami transisi vibrasional. Suatu molekul hanya dapat menyerap frekuensi tertentu. Molekul harus mempunyai momen dipol yang berubah selama vibrasi agar molekul dapat menyerap radiasi IR. Absorbansi atau penyerapan radiasi IR ini merupakan suatu proses kuantitatif (Rohman, 2014).

Tabel 2.2 Korelasi antara jenis vibrasi gugus fungsional dan frekuensi

Gugus	Jenis vibrasi	Frekuensi (cm ⁻¹)	Intensitas	
C-H	Alkana (ulur)	3000-2850	Kuat	
	CH ₃ (tekuk)	1450 dan 1375	Medium	
	CH ₂ (tekuk)	1465	Medium	
	Alkena (ulur)	3100-3000	Medium	
	Alkena (tekuk, keluar bidang)	1000-650	Kuat	
	Aromatis (ulur)	3150-3050	Kuat	
	Aromatis (tekuk, keluar bidang)	900-690	Kuat	
	Alkana (ulur)	± 3300	Kuat	
	Aldehid	2900-2800	Lemah	
			2800-2700	Lemah
C-C	Alkana	1200	Sedang	
C=C	Alkena	1680-1600	Medium-lemah	
	Aromatis	1600 dan 1475	Medium-lemah	
C≡C	Alkana	2250-2100	Medium-lemah	
C=O	Aldehid	1740-1720	Kuat	
	Keton	1725-1705	Kuat	
	Asam karboksilat	1725-1700	Kuat	
	Ester	1750-1730	Kuat	
	Amida	1680-1630	Kuat	
	Anhidrida	1810 dan 1760	Kuat	
	Asil klorida	1800	Kuat	
	C-O	Alkohol, eter, ester, asam karboksilat, anhidrida	1300-1000	Kuat
	O-H	Fenol		
Bebas		3650-3600	Medium	
Terikat hydrogen		3400-3200	Medium	
	Asam-asam karboksilat	3400-2400	Medium	
N-H	Amin primer, amin sekunder, amida			
	Ulur	3500-3100	Medium	
	Tekuk	1640-1550	Medium-kuat	
C-N	Amina	1350-1000	Medium-kuat	
C=N	Imina dan oksim	1690-1640	Medium-kuat	
C≡N	Nitril	2260-2240	Medium	
X=C=Y	Alena, ketena, isosianat, isotiosianat	2270-1940	Medium-kuat	
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 dan 11350	Kuat	
S-H	Merkaptan	2250	Lemah	
S=O	Sulfoksida	1050	Kuat	
	Sulfon, sulfonil klorida, sulfat, sulfonamid	1375-1300 dan 2350-1140	Kuat	
C-X	Flourida	1400-1000	Kuat	
	Klorida	785-540	Kuat	
	Bromide, iodide	<667	Kuat	

Sumber: Pavia *cit.* Rohman, 2014.

Bentuk-bentuk vibrasi molekul dalam spektroskopi inframerah secara umum terdapat dua bentuk, yakni:

1) Vibrasi regang atau ulur (*stretching*)

Vibrasi regang atau ulur (*stretching*) merupakan vibrasi sepanjang ikatan sehingga terjadi perpanjangan atau pemendekan ikatan. Terdapat 2 jenis vibrasi regang/ulur yaitu:

a. Uluran simetris (*symmetrical stretching*)

Uluran simetris merupakan unit struktur bergerak bersamaan dan searah dalam satu bidang datar.

b. Uluran asimetris (*antisymmetrical stretching*)

Uluran asimetris adalah unit struktur bergerak bersamaan dan tidak searah namun masih dalam satu bidang datar.

2) Vibrasi tekuk (*bending vibration*)

Vibrasi tekuk merupakan vibrasi yang disebabkan oleh sudut ikatan sehingga terjadi pembesaran atau pengecilan sudut ikatan. Terdapat 4 jenis vibrasi tekuk yakni:

a. Vibrasi guntingan (*scissoring*)

Vibrasi guntingan adalah unit struktur bergerak mengayun simetris dan masih dalam bidang datar.

b. Vibrasi goyangan (*rocking*)

Vibrasi goyangan adalah unit struktur bergerak mengayun asimetris namun masih dalam bidang datar.

c. Vibrasi kibasan (*wagging*)

Vibrasi kibasan adalah unit terstruktur bergerak mengibas keluar dari bidang datar.

d. Vibrasi pelintiran (*twisting*)

Vibrasi pelintiran adalah unit terstruktur berputar mengelilingi ikatan yang menghubungkan molekul induk dan berada di dalam bidang datar (Rohman, 2014).

Spektroskopi FTIR terdiri dari komponen-komponen utama yaitu:

1) Sumber Sinar

Sumber sinar yang digunakan spektrofotometer FTIR daerah IR tengah terbuat dari filamen Global atau Nernst yang dipanaskan dengan menggunakan listrik sampai temperatur 1000-1800°C (Purnamasari, 2016). Jika spektra IR jauh juga akan diukur, dapat digunakan lampu merkuri tekanan tinggi. Untuk IR dekat, dapat digunakan sumber sinar lampu-lampu Tungsten-Hidrogen (Rohman, 2014).

2) Interferometer

Interferometer pertama kali dirancang oleh Albert Abraham Michelson tahun 1891. Interferometer Michelson adalah interferometer pertama yang digunakan dalam instrumen komersial. Interferometer berfungsi untuk membawa berkas sinar, lalu memecahnya ke dalam 2 berkas sinar yang membuat salah satu sinar akan berjalan dengan jarak yang berbeda dengan yang sinar yang lain. Perbedaan jarak yang dilalui oleh 2 berkas sinar ini disebut perbedaan celah optik (*pathlength difference*) atau penghambatan optik. Interferometer akan menghasilkan interferogram yang merupakan plot dari intensitas versus waktu (spektra domain waktu), namun kurang efektif. Plot ini diganti dengan plot intensitas versus frekuensi atau bilangan gelombang (spektra domain versus frekuensi/bilangan gelombang) (Rohman, 2014).

3) Pemecah Sinar (*Beam Splitter*)

Berupa material transparan dengan indeks relatif (Purnamasari, 2016) yang terletak di antara cermin statis/diam dan cermin bergerak pada interferometer. Pemecah sinar (*beam splitter*) berfungsi untuk mentransmisikan setengah radiasi yang mengenainya dan merefleksikan/memantulkan setengah yang lain.

4) Daerah Cuplikan

Berkas acuan dan cuplikan masuk ke dalam daerah cuplikan dan masing-masing menembus sel acuan dan cuplikan yang bersesuaian (Purnamasari, 2016).

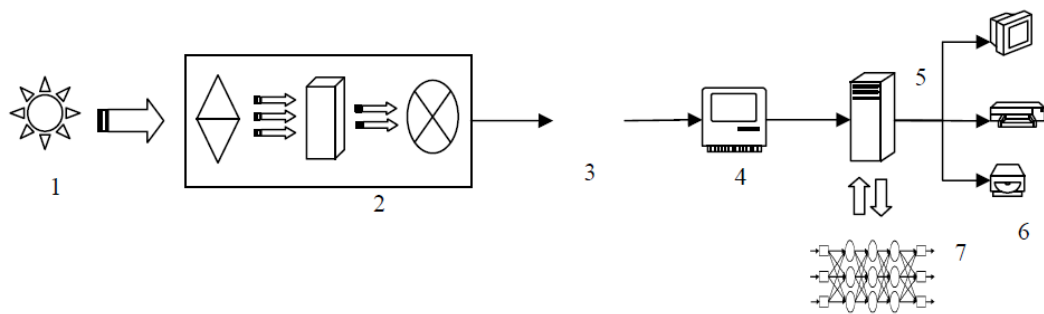
5) Detektor

Alat detektor berfungsi untuk mengukur energi pancaran yang lewat akibat adanya panas (Purnamasari, 2016). Untuk penggunaan rutin digunakan detektor normal berupa alat piroelektrik yang berisi Deuterium Triglisin Sulfat (DTGS) pada jendela alkali halida yang tahan panas. Untuk pekerjaan yang perlu sensitifitas lebih, digunakan detektor merkuri kadmium tellurida (MCT) yang harus didinginkan pada suhu nitrogen cair. Untuk pengukuran spektra IR dekat digunakan fotokonduktor timbal sulfida (Rohman, 2014).

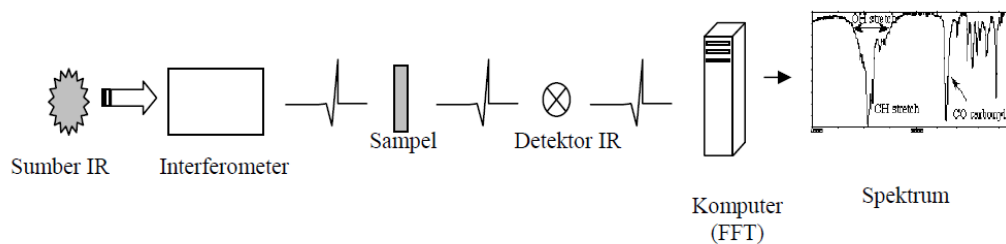
6) Komputer

Digunakan untuk mengendalikan instrumen, misal dalam hal kecepatan, batas, serta awal dan akhir proses pemindaian (*scanning*). Kemudian spektrum akan didigitalisasikan oleh komputer, yaitu komputer akan membaca spektra yang dihasilkan dari proses *scanning*. Selain itu, komputer juga dapat digunakan untuk memanipulasi spektrum, contohnya untuk melakukan derivatisasi, pengurangan dan penjumlahan spektra, serta untuk *overlay* antarspektra (Rohman, 2014).

Radiasi dari sumber sinar dilewatkan melalui interferometer ke sampel sebelum mencapai detektor. Pada saat penguatan sinyal (amplifikasi), dimana kontribusi frekuensi tinggi dihilangkan dengan filter, data akan diubah menjadi bentuk digital dengan *analog-to-digital* converter dan dipindahkan ke komputer untuk menjalani transformasi fourier (Rohman, 2014). Proses perubahan sinyal pada FTIR ditunjukkan pada gambar 2.3 dan instrumentasi dari FTIR ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Komponen instrumentasi spektroskopi FTIR (1) Sumber cahaya IR; (2) Spektrometer terdiri dari interferometer, sampel, dan detektor; (3) Penguat (*Amplifier*) dan *Analog to Digital Converter (ADC) 0804*; (4) Port Printer; (5) Komputer; (6) Periferal Input/Output (I/O), yaitu monitor, printer, disk drive/hard disk; (7) Program jaringan syaraf tiruan. (Suseno dan Firdausi, 2008)



Gambar 2.3 Proses perubahan sinyal pada spektroskopi FTIR (Suseno dan Firdausi, 2008)

Pengolahan sampel/cuplikan pada spektrofotometer inframerah dapat dilakukan dengan berbagai cara. Cara yang digunakan tergantung jenis sampel yang akan dianalisis, yaitu gas, cairan, atau padatan. Secara garis besar, spektrum IR diperoleh dengan cara transmisi atau pantulan (*reflectance*).

1. Teknik Transmisi

Teknik transmisi adalah cara yang populer digunakan untuk memperoleh spektra IR, yaitu dengan melewati berkas sinar inframerah melalui sampel. Teknik ini memiliki keuntungan, diantaranya spektra transmisi mempunyai rasio sinyal *noise* yang tinggi, relatif tidak mahal, dan bersifat universal karena bekerja pada sampel padat, cair, gas dan polimer. Kerugiannya terletak pada ketebalan sampel yang dianalisis, idealnya harus berketebalan 1-20 mikron. Jika kurang dari 1 mikron akan

menghasilkan absorbansi yang terlalu kecil untuk dideteksi, sehingga perlu mengatur ketebalan dan konsentrasi sampel agar dapat dianalisis. Selain itu, penyiapan sampel perlu waktu yang lama.

a. Spektra transmisi sampel padat

Terdapat tiga cara untuk mengolah sampel padatan yaitu:

1) Lempeng Kalium Bromida (Pelet KBr)

Pelet KBr digunakan untuk memperoleh spektra IR dari sampel padat terutama untuk sampel-sampel serbuk. KBr bersifat *inert*, transparan terhadap sinar IR, dapat beraksi sebagai pendukung dan pengencer sampel.

2) *Mull*

Mull atau lumpuran dibuat dengan menggerus sampel/cuplikan sampai halus, kemudian dicampur dengan 1-2 tetes minyak hidrokarbon berat/parafin cair (Nujol) hingga menjadi lumpuran.

3) Lapisan Tipis

Lapisan tipis padatan cuplikan pada lempeng natrium klorida dapat diperoleh dengan meneteskan larutan cuplikan pada permukaan lempeng natrium klorida. Pelarut yang digunakan mudah menguap, sehingga didapatkan lapisan tipis pada natrium klorida.

b. Spektra Transmisi Cairan

Pemilihan pelarut yang sesuai harus dilakukan sebelum memperoleh spektrum IR dari sampel larutan. Cuplikan padat dapat dilarutkan dalam pelarut seperti karbon tetraklorida, karbon disulfida, atau kloroform.

Ada 2 teknik pengolahan sampel cairan yaitu:

1) Metode Lapisan Tipis Kapiler

Lapisan tipis kapiler dibuat dengan 1 tetes sampel yang diletakkan di antara 2 jendela transparan inframerah.

2) Metode Sel Cairan Tertutup

Teknik ini untuk cairan yang volatil, berbau menyengat, cairan toksik. Cairan tersebut tidak menguap dan tidak menyebabkan

bahaya, karena metode ini mempunyai pengemas yang menutup cairan didalam sel, akibatnya akan mencegah penguapan.

c. Spektra Transmisi Gas

Cuplikan gas dimasukkan ke dalam sel gas. Jendela transparan terhadap inframerah, biasanya NaCl digunakan sehingga sel dapat diletakkan langsung dalam berkas cuplikan.

2. Teknik Reflektan (Pantulan)

Teknik reflektan (pantulan) digunakan untuk sampel yang sulit untuk dianalisis dengan teknik transmisi. Metode reflektan dibagi menjadi 2 kategori, yaitu:

a) *Attenuated Total Reflectance* (ATR)

Teknik ATR yaitu pengukuran pantulan internal dengan menggunakan sel *attenuated total reflectance* (ATR) yang mengalami kontak langsung dengan sampel. ATR dapat digunakan untuk sampel padat, cair, semipadat, dan lapisan tipis. ATR dilakukan menggunakan aksesoris dalam kompartemen sampel spektrofotometer FTIR, dimana bagian inti aksesoris ATR terdapat kristal (berupa bahan transparan IR) dengan indeks bias tinggi dan terbuat dari bahan yang mempunyai kelarutan air yang rendah. Kristal yang digunakan adalah seng selenida (ZnSe), talium iodida/talium bromida (KRS-5), dan germanium.

Spektroskopi IR ATR menggunakan fenomena pemantulan internal total. Berkas radiasi yang masuk ke kristal akan mengalami pemantulan internal total ketika sudut datang pada permukaan antara sampel dan kristal lebih besar dari sudut kritisnya. Berkas sinar IR memantulkan di permukaan kristal beberapa kali sebelum meninggalkan kristal. Sifat teknik ATR menghasilkan kontribusi pelarut yang kurang intens terhadap keseluruhan spektrum IR, sehingga spektra pelarut dapat dengan mudah dikurangkan dari spektrum sampel yang dikehendaki.

b) Reflektan

Teknik ini merupakan salah satu jenis reflektan eksternal. Reflektan eksternal mengukur radiasi yang dipantulkan dari sebuah permukaan. Bahan yang digunakan harus memantul atau diikatkan dengan bahan yang memantul. Dalam pantulan eksternal, radiasi yang mengenai difokuskan ke sampel. Terdapat dua bentuk pantulan dapat terjadi, yakni: (1) *specular* atau pemantulan yang terjadi pada antarmuka yang mengkilap; (2) *diffuse* (menyebarkan).

Pantulan *specular* terjadi ketika sudut radiasi yang dipantulkan sama dengan sudut datang, indeks bias, kekasaran permukaan, dan sifat-sifat serapan sampel. Mayoritas bahan memerlukan energi yang dipantulkan hanya 5-10%, tetapi daerah dengan serapan kuat akan memunculkan intensitas pantulan lebih besar. Pada teknik *specular*, sampel padat diletakkan pada permukaan yang rata. Teknik *specular* umum digunakan untuk sampel-sampel cairan yang dapat dituang melalui Teflon.

Pada teknik pantulan menyebarkan (*diffuse*), energi yang memenerasikan satu atau lebih partikel dipantulkan ke segala arah dan komponen ini disebut dengan pantulan menyebarkan (*diffuse reflectance*), teknik ini sering dikenal dengan *diffuse reflectance for infrared fourier transform spectroscopy* (DRIFTS) atau *diffuse reflectance spectroscopy* (DRS). Persiapan teknik DRIFTS, sampel serbuk dicampur dengan serbuk KBr, tetapi tidak memerlukan pembuatan pelet dengan tekanan hidrolis. Sel DRIFTS akan memantulkan sinar ke serbuk dan mengumpulkan energi yang dipantulkan balik melalui sudut yang lebar. Sinar yang dipantulkan secara menyebarkan dapat dikumpulkan secara langsung dari bahan dalam sebuah wadah *sampling*. Hasil DRIFTS dapat dipengaruhi ukuran partikel dan panjang gelombang IR, diatasi dengan sampel dicampur KBr dan diambil spektrum di wilayah akurat dari IR tengah 1200-400 cm^{-1} . Teknik DRIFTS dapat meningkatkan resolusi spektrum dan mengurangi gangguan pita dari air

dibandingkan dengan teknik transmisi. DRIFTS sangat sesuai untuk sampel-sampel serbuk, serat dan sampel padat.

(Rohman, 2014, hal. 38-52; Beasley *et al.*, 2014)

D. Hukum Lambert-Beer's

Dasar analisis kuantitatif dalam spektrofotometri adalah hukum Lambert Beer's yang menjelaskan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansinya. Rumus hukum Lambert Beer's adalah sebagai berikut :

$$A = \epsilon bc$$

Yang mana A adalah absorbansi; ϵ adalah absorptivitas; b adalah tebal tempat sampel; c adalah konsentrasi. Untuk cairan, b dapat dinyatakan dengan micron, c dengan mol/liter atau molar (M), meskipun demikian dapat digunakan satuan lain sepanjang konsisten dalam penggunaannya. Absorptivitas (ϵ) merupakan konstanta proporsionalitas antara konsentrasi dengan absorbansi, yang nilainya berubah sebagai fungsi dari bilangan gelombang/frekuensi yang digunakan, dan nilainya berbeda antar molekul. Satuan ϵ adalah (konsentrasi x tempat sampel)⁻¹, dengan demikian satuan ϵ ditentukan oleh satuan b dan c karena absorbansi tidak bersatuan.

Respon spektroskopi IR untuk tujuan analisis kuantitatif dapat diukur sebagai tinggi puncak, luas puncak, rasio tinggi puncak atau rasio luas puncak. Pada spektrum IR, sumbu -y adalah absorbansi atau transmitansi, sumbu -x merupakan bilangan gelombang (cm⁻¹). Dalam analisis kualitatif dapat digunakan absorbansi ataupun transmitansi, namun dalam analisis kuantitatif yang digunakan adalah absorbansi karena absorbansi berbanding secara langsung dengan konsentrasi sebagaimana hukum Lambert Beer's. Adapun bentuk rumus hukum Lambert Beer's analog dengan persamaan regresi linier, yaitu :

$$y = bx + a$$

Yang mana : y adalah nilai pada sumbu -y; b adalah kemiringan (*slope*) garis lurus; x adalah nilai pada sumbu -x; dan a adalah intersep (perpotongan garis pada sumbu y) (Rohman, 2014).

E. Kemometrik

Kemometrik merupakan cabang ilmu pengetahuan yang mengaplikasikan teori matematika dan statistik untuk mengolah data kimia. Kemometrik dikenal dalam spektroskopi untuk meningkatkan kualitas data yang diperoleh. Pada awal penggunaannya, hanya untuk mengolah data spektra. Saat ini memungkinkan untuk memperlakukan sejumlah besar informasi yang berasal dari konsentrasi sampel dalam waktu cepat (Rohman, 2014).

Berdasarkan jumlah variabelnya, kalibrasi dikelompokkan menjadi kalibrasi univariat dan kalibrasi multivariat. Kalibrasi univariat merupakan kalibrasi yang jumlah variabelnya adalah satu, misalnya dalam melakukan prediksi konsentrasi obat dengan menggunakan data absorbansi di satu bilangan gelombang tertentu. Kalibrasi multivariat menggunakan banyak variabel untuk melakukan prediksi. Kemometrik akan lebih banyak berkaitan dengan kalibrasi multivariat ini (Rohman, 2014). Kalibrasi sistem diperlukan sejumlah sampel yang mengandung campuran analit yang berbeda serta spektrum diukur untuk tiap sampel. Dalam pendekatan klasik pada masalah ini, intensitas adalah variabel tergantung dan konsentrasi sebagai variabel bebas. Teknik yang dinamakan sebagai regresi linier biasa dapat digunakan untuk menemukan serangkaian persamaan regresi yang menghubungkan antara absorbansi pada tiap-tiap bilangan gelombang dengan konsentrasi analit. Dengan mengasumsikan bahwa absorbansi pada tiap bilangan gelombang adalah jumlah dari absorbansi tiap komponen (Rohman, 2014).

Spektroskopi IR mampu menghasilkan sejumlah data dari beberapa komponen secara simultan dalam satu kali pembacaan sampel. Jadi, beberapa variabel (parameter) diukur untuk tiap sampel yang akan menghasilkan data multivariat (Rohman, 2014). Data multivariat adalah suatu data yang dihasilkan dari pengukuran banyak variabel pada satu sampel yang sama. Penggunaan data multivariat dalam analisis spektroskopi IR, contohnya adalah untuk analisis campuran obat menggunakan kisaran frekuensi yang lebar

misalnya frekuensi 4000-400 cm^{-1} , sehingga jumlah variabel tersebut sangat banyak.

Tujuan dari beberapa metode analisis multivariat adalah untuk mereduksi kumpulan data, dimana cukup sering ditemukan beberapa korelasi antara variabel yang memberikan informasi yang berlebihan. *Principal component analysis* (PCA) adalah suatu teknik untuk mengurangi beberapa informasi yang berlebihan tersebut yaitu dengan mengurangi jumlah data yang memiliki korelasi, dimana nantinya PCA akan menemukan komponen utama dari beberapa data tersebut yang menyumbang sebagian besar variasi dalam kumpulan data, disamping itu maka akan ada beberapa variabel yang tidak berkontribusi signifikan (Miller dan Miller, 2010). Dimana, tujuan PCA disini akan mengeliminasi komponen utama yang terkait *noise* sehingga meminimalkan efek kesalahan pengukuran. Jadi, PCA merupakan metode matematis untuk mereduksi data multivariat yang memiliki korelasi antar variabel sehingga dapat membangun model multivariat linier dari data yang kompleks tersebut. Metode ini dilakukan dengan vektor basis ortogonal atau yang disebut dengan komponen utama (*principal component*). Komponen utama dapat mengekstrak informasi sebanyak-banyaknya dari suatu data. *First principal component* (PC1) akan menunjukkan variasi terbanyak dalam suatu kelompok data, sedangkan *second principal component* (PC2) akan menunjukkan variasi terbesar kedua dari serangkaian variabel, dan seterusnya (Miller dan Miller, 2010). PCA akan memudahkan dalam visualisasi pengelompokan data, evaluasi awalan kesamaan antar kelompok dan menemukan faktor dibalik pola yang teramati melalui korelasi dengan sarana faktor kimia atau fisika-kimia.

Partial least square (PLS) merupakan salah satu kemometrika yang didasarkan pada metode regresi yang dapat menghubungkan antara spektra vibrasional dengan sifat sampel yang dapat dikuantifikasi (contoh: konsentrasi analit), yang mengacu pada data multivariat. Sehingga regresi yang jumlah variabelnya lebih dari satu ini disebut regresi multivariat (Rohman, 2014). PLS dapat memperkirakan serangkaian variabel tak bebas (respon) dan variabel

bebas (prediktor) yang jumlahnya sangat banyak, memiliki sistematik linier, dengan atau tanpa data yang hilang dan memiliki kolinieritas yang tinggi (Miller dan Miller, 2010). Sebagaimana PCR (*principal component regression*), PLS menggunakan kombinasi-kombinasi linier variabel prediktor dibandingkan menggunakan variabel asal, yang mana PLS memilih kombinasi liniernya berbeda dengan PCR. Dalam PCR komponen utama (PC) dipilih sedemikian rupa sehingga PC menggambarkan sebanyak mungkin variabel prediktor tanpa memperhatikan kekuatan hubungan antara variabel-variabel prediktor dan respon. Sementara, dalam PLS variabel-variabel yang menunjukkan korelasi yang tinggi dengan variabel respon diberikan berat berlebih karena variabel-variabel ini lebih efektif untuk prediksi, dalam cara ini kombinasi-kombinasi linier variabel-variabel prediktor dipilih yang sangat berkorelasi dengan variabel respon dan menggambarkan variasi dalam variabel prediktor. Sebagaimana PCR, diharapkan bahwa hanya beberapa kombinasi linier variabel prediktor yang diperlukan untuk menggambarkan variasi paling besar. Regresi PLS memiliki kelebihan berupa pembentukan komponen regresi PLS yang menggambarkan hubungan antara variabel x dan y . Setiap komponen pada regresi PLS diperoleh dengan memaksimalkan kovarian antara variabel y dengan setiap fungsi linier yang memungkinkan dari variabel x . Dalam FTIR, PLS sering digunakan untuk mengekstrak informasi dari spektra yang kompleks dengan puncak-puncak yang tumpang tindih, adanya pengotor, dan adanya *noise* dari instrumen spektrometer FTIR (Rohman, 2014).

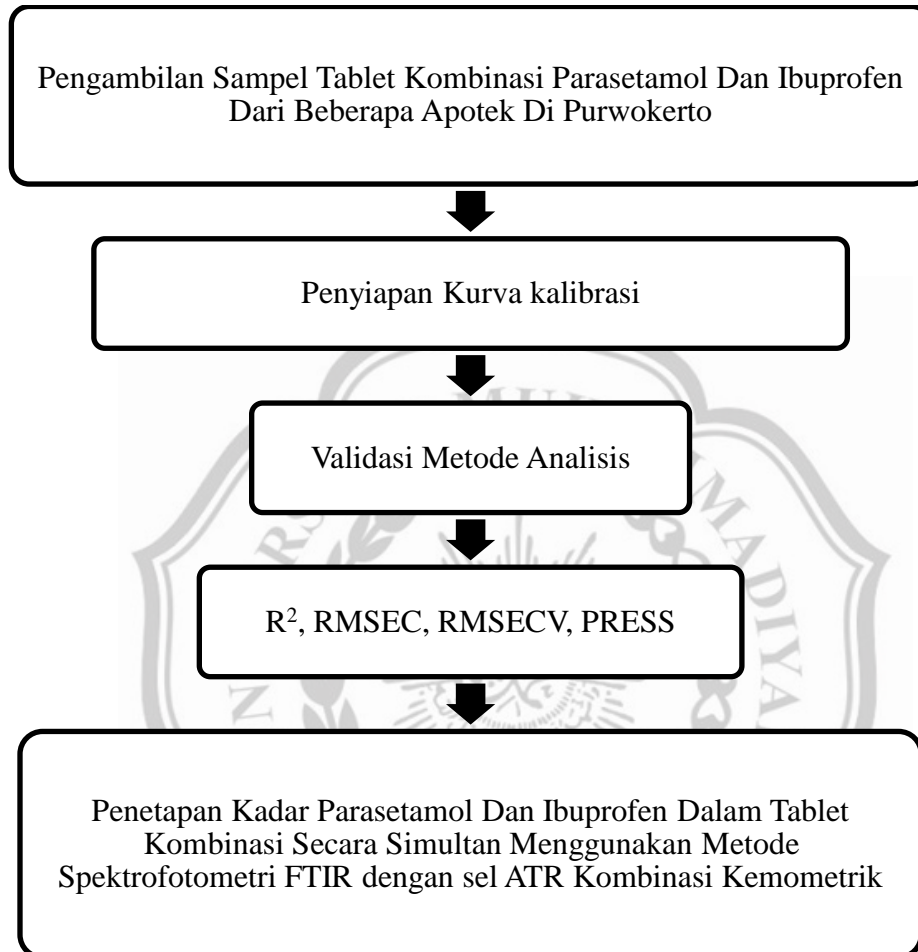
Evaluasi dari kalibrasi PLS dapat menggunakan *root mean square error of calibration* (RMSEC) dan koefisien determinasi (R^2). Nilai R^2 menunjukkan seberapa besar variasi dari setiap variabel Y (konsentrasi) yang mampu dijelaskan oleh variabel independen (X) (Rohman, 2014). Nilai RMSEC menunjukkan selisih kadar terukur dengan kadar sebenarnya sehingga semakin rendah nilai RMSEC maka model kalibrasi semakin baik karena faktor kesalahannya kecil (Gulo, 2016) yang mana ditunjukkan dengan nilai RMSEC yang mendekati nol (Rohman, 2014). Model PLS lalu akan disilangkan dengan teknik *leave-one-out*, yaitu kinerja dari prediksi dapat divalidasi dengan menggunakan validasi silang (*cross validation*) teknik “*leave-one-out*”

(mengeluarkan satu persatu). Dalam teknik ini, nilai sampel pertama (sampel A) dibuang dari serangkaian data (sampel A-J) dan nilai-nilai sampel tersisa (sampel B-J) digunakan untuk menemukan persamaan prediksi. Persamaan yang baru ini digunakan untuk menemukan nilai terprediksi C_1 untuk sampel A. Prosedur ini diulangi terus-menerus meninggalkan satu persatu sampel dan dimodelkan dengan sampel yang tersisa. Selanjutnya perbedaan nilai sebenarnya dengan nilai terprediksi untuk tiap sampel dihitung. Total kuadrat nilai-nilai ini disebut dengan *predicted residual error sum of squares* (PRESS) (Rohman, 2014). Nilai PRESS adalah nilai yang menunjukkan kesalahan prediksi saat proses pemodelan dan merupakan bagian dari validasi untuk model kalibrasi multivariat PLS (Gulo, 2016). Semakin dekat nilai PRESS ke nilai nol (0) maka daya prediktif model semakin baik. Untuk mengevaluasi kesesuaian model prediksi pada *cross validation* dapat diketahui dengan menghitung nilai RMSECV (*root mean square error of cross validation*), dimana nilai RMSECV semakin mendekati nol maka kesesuaian model prediksi pada *cross validation* semakin baik (Rohman, 2014).

PLS telah banyak dilakukan, seperti yang telah dilakukan oleh Khaskheli *et al.* (2012) untuk mengolah data spektroskopi FTIR dari ibuprofen dalam urin dan formulasi tablet. Selain itu, Mallah *et al.* (2013) juga telah menggunakan PLS untuk mengolah data IR dari parasetamol dalam formulasi sediaan padat. Mallah *et al.* (2012), menggunakan PLS untuk mengolah data IR dari parasetamol dan ibuprofen dalam formulasi tablet.

F. Kerangka Konsep

Kerangka konseptual dari penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 2.4 sebagai berikut.



Gambar 2.4 Kerangka konsep

G. Hipotesis

Metode spektrofotometri FTIR dengan sel ATR kombinasi kemometrik dapat digunakan untuk penetapan kadar parasetamol dan ibuprofen dalam tablet kombinasi secara simultan.