

UJI IDENTIFIKASI IBUPROFEN PADA OBAT HERBAL  
DENGAN KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

I G.D.B. Temaja, 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

Belakangan ini, terjadi peningkatan tren penggunaan obat herbal di masyarakat. Melihat kecenderungan tersebut, beberapa pihak yang tidak bertanggungjawab memanfaatkannya sebagai peluang untuk meraih keuntungan yaitu dengan menambahkan bahan kimia obat (BKO) ke dalam produk obat herbal untuk meningkatkan efek obat tersebut. Ibuprofen adalah salah satu BKO yang sering ditambahkan secara ilegal ke dalam obat herbal. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji identifikasi ibuprofen pada obat herbal untuk mengontrol kualitas obat herbal dan menjamin perlindungan konsumen. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode KLT-Spektrofotodensitometri untuk identifikasi senyawa ibuprofen pada obat herbal.

Ekstraksi sampel dilakukan dengan menggunakan kolom SPE C<sub>8</sub>-Cation Exchange dan fraksinya dipisahkan menggunakan 2 sistem KLT yang berbeda yaitu sistem TE dan TF. Kemudian, plat KLT dipindai pada panjang gelombang 210 nm menggunakan TLC Scanner 3 (Camag-Mutenz-Switzerland) untuk dibuat kromatogramnya. Spektrum masing-masing puncak dibaca pada rentang panjang gelombang 190 – 400 nm. Identifikasi senyawa dilakukan berdasarkan nilai  $hR_f^c$  dan korelasi spektrum in situ-nya dengan spektrum standar pada library Camag WinCats.

Hasil uji identifikasi menunjukkan bahwa fraksi yang didapatkan mengandung ibuprofen. Validasi metode mencakup spesifisitas dengan kemurnian spektrum puncak  $> 0,99958$ , presisi ( $hR_f$  dan Area Under Curve (AUC)) dengan koefisien variansi (KV)  $< 2\%$ , linearitas dengan  $r > 0,99907$  dan  $sdv < 5\%$ , serta Limit of Detection (LOD) 21,22ng.

---

Kata kunci: identifikasi, ibuprofen, TLC-Spektrofotodensitometri, SPE

1. PENDAHULUAN

Belakangan ini, terjadi peningkatan tren penggunaan obat herbal di masyarakat. Melihat kecenderungan tersebut, beberapa pihak yang tidak bertanggungjawab memanfaatkannya sebagai peluang untuk meraih keuntungan yaitu dengan menambahkan bahan kimia obat (BKO) ke dalam produk obat herbal untuk meningkatkan efek obat tersebut.

Menurut laporan BPOM, telah ditemukan senyawa ibuprofen pada produk obat herbal yang memiliki khasiat sebagai penurun panas (BPOM RI, 2008). Ibuprofen memiliki sifat antipiretik yang merangsang pusat pengaturan panas di hipotalamus (bagian otak yang bersifat

sangat peka, salah satunya terhadap suhu) sehingga mengakibatkan vasodilatasi perifer dengan bertambahnya pengeluaran panas yang disertai dengan keluarnya banyak keringat (Tjay dan Rahardja, 2008).

KLT-Spektrofotodensitometri dilaporkan telah dapat digunakan untuk uji skrining dan konfirmasi pada analisis toksikologi (Wirasuta, 2012). KLT-Spektrofotodensitometri merupakan metode yang sederhana, murah, handal, dan memiliki spesifisitas yang cukup untuk uji konfirmasi (Flanagan et al., 2007). Adapun tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode KLT-Spektrofotodensitometri untuk identifikasi senyawa ibuprofen pada obat herbal.

## 2. MATERI DAN METODE

### 2.1 Alat

Peralatan gelas yang umum dipakai dalam laboratorium analisis, ballfiller, timbangan analitik (AND GR-200), oven (Mettler), alat pengaduk mekanik (Ika vibrax VXR basic), pompa vakum (Gast), manifold (Phenomenex), pH meter (Oakton), Linomat 5 (Camag-Muttenz-Switzerland), bejana kromatografi (Camag-Muttenz-Switzerland), Spektrofotodensitometer TLC-Scanner 3 (Camag-Muttenz-Switzerland).

### 2.2 Bahan

Bahan kimia dan pelarut yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis (Merck-Germany) yaitu metanol, kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ), asam asetat, n-heksana, diklorometana, isopropanol, amonium hidroksida, asam hidroklorida ( $\text{HCl}$ ), etil asetat, kloroform, dan aquades. Fase diam yaitu plat aluminium TLC Silika Gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck-Germany). Kolom SPE Strata Screen C (Phenomenex). Senyawa standar ibuprofen (BPOM RI), salbutamol sulfat (Ferron Par Pharmaceutical), difenhidramin HCl (BPOM RI), diazepam (BPOM RI), klordiazepoksid, natrium diklofenak (Ferron Par Pharmaceutical), kodein (BPOM RI), bromheksin (BPOM RI).

### 2.3 Metode

#### 2.3.1 Penyiapan Larutan

Larutan yang dibuat meliputi larutan  $\text{NaOH}$  0,2 M, larutan dapar fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M pH 6, larutan baku stok ibuprofen 2 mg/mL, larutan baku kerja ibuprofen 500  $\mu\text{g/mL}$ , larutan standar pembanding dengan konsentrasi 5, 50, 100 dan 500  $\mu\text{g/mL}$ , larutan fase gerak sistem TE (etil asetat: metanol: ammonia (85:10:5 %v/v)) dan TF (etil asetat), larutan standar senyawa pengkoreksi  $hR_f$  masing-masing dengan konsentrasi 250  $\mu\text{g/mL}$  (TF = klordiazepoksid, natrium diklofenak, dan diazepam; TE = salbutamol sulfat, kodein, difenhidramin HCl, dan bromheksin).

#### 2.3.2 Metode Ekstraksi

##### A. Penyiapan Kolom SPE

Penyiapan Kolom SPE Strata Screen C mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Purbandika (2011) yaitu dengan mengelusi kolom menggunakan 3 mL metanol, dilanjutkan dengan 3 mL air, dan 3 mL dapar fosfat 0,1 M pH 6. Laju elusi diatur 1,5 mL/menit menggunakan alat vakum sampai tersisa sedikit eluen untuk menjaga agar kolom tidak kering (Purbandika, 2011).

##### B. Penyiapan Sampel

Sebanyak 500  $\mu\text{L}$  senyawa standar ibuprofen 50  $\mu\text{g/mL}$  ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  dapar fosfat 0,1 M pH 6. Campuran dikocok dalam ultrasonic selama 30 menit.

##### C. Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode yang dikembangkan oleh Purbandika (2011) dimana analit dielusi dengan menggunakan fase gerak metanol. Isolat ditampung kemudian diuapkan sampai kering pada suhu 60°C di atas tangas air. Ekstrak direkonstitusi dengan 100  $\mu\text{L}$  metanol sehingga konsentrasi yang didapat sebesar 250  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 2.3.3 Sistem Pemisahan Dengan KLT-Spektrofotodensitometri

Dua buah plat dengan ukuran 10 x 10 cm dicuci dan diaktivasi. Totolan awal 10 mm dari tepi kiri dan 10 mm dari bawah plat, lebar pita 3 mm, dan jarak antar noda 6 mm. Totolan 1 – 3 adalah sampel ekstraksi ibuprofen, standar pengkoreksi  $hR_f$  ditotolkan pada noda ke-4, sedangkan standar pembanding ibuprofen pada noda ke-5 sampai dengan ke-12. Semua noda ditotolkan pada 2 plat yang terpisah. Plat pertama dielusi dengan fase gerak sistem TE dan plat kedua dengan fase gerak sistem TF. Chamber dijenuhkan sebelum dielusi selama 30 menit. Elusi dilakukan sampai jarak pengembangan 8 cm, kemudian plat dikeringkan pada suhu 60°C selama 10 menit di dalam oven. Plat yang sudah kering dipindai dengan spektrofotodensitometer TLC-Scanner 3 (Camag-Muttenz-Switzerland) pada panjang gelombang 210 nm dan spektrum masing-masing puncak dibaca pada rentang panjang gelombang 190 - 400 nm serta diuji kemurnian spektrumnya.

#### 2.3.4 Analisis Data

Nilai  $hR_f^c$  diperoleh dengan mengacu pada Zeeuw et al (1992) yang mengoreksi  $hR_f$  dengan metode poligonal menggunakan senyawa standar pengoreksi  $hR_f$ . Modifikasi dilakukan pada senyawa standar pengoreksi  $hR_f$  yang digunakan menjadi salbutamol ( $hR_f^c = 20$ ), kodein ( $hR_f^c = 35$ ), difenhidramin ( $hR_f^c = 65$ ), dan bromheksin ( $hR_f^c = 88$ ) untuk sistem TE serta klordiazepoksid ( $hR_f^c = 10$ ), diklofenak ( $hR_f^c = 27$ ), dan diazepam ( $hR_f^c = 49$ ), untuk sistem TF. Perhitungan  $hR_f^c$  dengan metode poligonal secara otomatis mengacu pada Wirasuta (2012) yang memanfaatkan WinCATS-Speclib-Tool (Camag -Switzerland).

Untuk memastikan identitas puncak kromatogram digunakan WinCATS-Speclib-Tool dengan melihat nilai  $hR_f^c$  yang didapatkan  $\pm 11$  untuk sistem TE dan  $\pm 8$  untuk sistem TF serta korelasi spektrum in situ analit dengan spektrum pada library. Nilai korelasi spektrum minimum ditetapkan sebesar 0,8 (Wirasuta, 2012).

#### 2.3.5 Uji Validasi Metode Analisis

Validasi metode untuk analisis kualitatif mencakup spesifisitas, presisi, linearitas, dan batas deteksi (United Nations Office on Drugs and Crime, 2009).

##### A. Penentuan Spesifisitas, Linearitas, dan LOD

Penotolan sampel dan standar untuk uji validasi dikerjakan pada prosedur 2.3.3. Noda dipindai pada panjang gelombang maksimum in situ ibuprofen (224 nm) pada library Camag (1999). Spektrum setiap puncak dipindai pada panjang gelombang 190 – 400 nm. Uji spesifisitas dilakukan dengan tes purity peaks 85% puncak (Camag, 1999).

##### B. Penentuan Presisi

Disiapkan 2 plat KLT dengan ukuran 7,5 x 10 cm yang telah dicuci dan diaktivasi sebelumnya. Penentuan presisi dilakukan dengan menggunakan 3 variasi konsentrasi (80, 100, 120 %) dengan 3 kali pengulangan (Harmita, 2004). Ditotolkan senyawa standar ibuprofen dengan 3 variasi massa penotolan (ng/totolan) berbeda (400, 500, dan 600 ng) dengan 3 kali pengulangan menggunakan alat Linomat 5. Plat dielusi seperti pada prosedur 2.3.3. Plat yang

sudah kering selanjutnya dipindai seperti pada prosedur 2.3.5 (A).

##### C. Perhitungan Nilai Parameter Validasi

Spesifisitas ditentukan dari kemurnian puncak dengan melihat korelasi spektrum pada  $R_f$  awal dengan  $R_f$  maksimum serta  $R_f$  maksimum dengan  $R_f$  akhir (Camag, 1999). Nilai korelasi spektrum minimum ditetapkan sebesar 0,999 (Indrayanto et al., 2009).

Nilai linearitas dilihat dengan membuat grafik antara konsentrasi dan AUC. Berdasarkan grafik tersebut ditentukan persamaan regresi linier ( $y = bx + a$ ) dan koefisien korelasinya ( $r$ ) dimana  $r$  yang ditetapkan diatas 0,999 (Lawson, 1996). Dengan persamaan regresi linear yang diperoleh, selanjutnya dihitung nilai simpangan baku residual  $S(y/x)$  dan batas deteksi (LOD).

Perhitungan presisi dilakukan terhadap  $hR_f$  dan AUC senyawa pada 2 sistem KLT. Presisi dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) dan koefisien variansi (KV) (Indrayanto et al., 2009).

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Uji Identifikasi

Kromatogram hasil elusi pada sistem TE dan TF dapat dilihat pada Gambar A.1 dan A.2. Nilai  $hR_f$  dari masing-masing senyawa standar pengoreksi  $hR_f$  dapat dilihat pada Tabel B.1. Proses koreksi nilai  $hR_f$  puncak fraksi hasil SPE menggunakan metode poligonal dilakukan secara otomatis dengan WinCATS-Speclib-Tool seperti pada Gambar A.3 dan A.4. Jumlah senyawa yang berada pada rentang  $hR_f^c \pm \text{error}$  window dari masing-masing sistem KLT ini disebut dengan Hit Factor (HF). Adapun HF pada sistem TE maupun TF dapat dilihat pada Tabel B.2. Spektrum analit di kedua sistem KLT ditunjukkan oleh Gambar A.5.

Berdasarkan HF yang didapatkan, identifikasi dilakukan dengan memilih senyawa yang memiliki nilai korelasi spektrum analit dengan spektrum pada library Camag WinCats terbaik. Tabel B.3 menunjukkan hasil identifikasi yang dilakukan pada 2 sistem KLT. Dari hasil pada Tabel B.2 dan terlihat bahwa senyawa yang berada pada rentang  $hR_f^c \pm 11$  (error window TE) dan  $hR_f^c \pm 8$  (error window TF) dengan nilai korelasi spektrum 0,99729; 0,99752; 0,99842 pada sistem TE dan 0,92455;

0,94532; 0,93654 pada sistem TF adalah ibuprofen. Identifikasi yang dilakukan pada 2 sistem KLT seperti pada Tabel B.3 mendapatkan kesesuaian hasil baik pada sistem TE maupun TF dimana ibuprofen adalah senyawa pada fraksi hasil SPE.

### 3.2 Validasi Metode Analisis

Hasil uji spesifisitas dengan melihat kemurnian puncak dapat dilihat secara lengkap pada Tabel B.4. Dari hasil uji purity peaks menunjukkan bahwa puncak ibuprofen merupakan puncak murni dimana korelasi spektrum pada posisi  $R_f$  awal dengan  $R_f$  maksimum sebesar 0,99983; 0,99987; 0,99984 pada sistem TE dan 0,99963; 0,99952; 0,99975 pada sistem TF serta korelasi  $R_f$  maksimum dengan  $R_f$  akhir sebesar 0,99984; 0,99985; 0,99983 pada sistem TE dan 0,99962; 0,99958; 0,99983 pada sistem TF.

Hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel B.5 dan B.6. Uji presisi  $hR_f$  dilakukan dengan  $n = 9$  menghasilkan nilai  $KV < 2\%$ . Uji presisi AUC dengan konsentrasi 80, 100, dan 120 % dengan 3 kali pengulangan menghasilkan nilai  $KV < 2\%$ .

Persamaan regresi linear yang didapatkan adalah  $y = 5,2429x - 49,065$  dengan  $r = 0,99907$  dan  $sdv 4,17\%$  pada sistem TE dan  $y = 5,3021x - 181,0223$  dengan  $r = 0,99975$  dan  $sdv 2,42\%$  pada sistem TF. Batas deteksi (LOD) yang didapatkan adalah 21,22 ng.

## 4. KESIMPULAN

Sistem ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi ibuprofen pada obat tradisional dengan spesifisitas (kemurnian spektrum)  $> 0,99958$ , linearitas dengan  $r > 0,99907$  dan  $sdv < 4,17\%$ , batas deteksi 21,22 ng serta presisi  $hR_f$  dan AUC dengan  $KV < 2\%$ .

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan 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 atas bantuan tempat dan alat dalam mendukung penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- BPOM RI. (2008). Metode Analisis PPOMN th 2008. Jakarta: Balai Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Camag. (1999). Welcome to the CAMAG WinCats Tutorial: WinCats Planar Chromatography. Switzerland: CAMAG.
- 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 Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Majalah Ilmu Kefarmasian, vol 1 (3). hal 117-135.
- Indrayanto, G., M. Yuwono, Suciati. (2009). TLC: Validation of Analyses. Jack Cazes. 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.
- Purbandika, I M.D.M. (2011). Metode Ekstraksi Fase Padat (Solid Phase Extraction) Untuk Narkotika dan Psikotropika Dalam Urin. Skripsi. Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. hal 44.
- Tjay, T. H. & K. Rahardja. (2008). Obat-Obat Penting. Jakarta: PT Elex Media Komputindo. hal 314.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. New York: United Nations. p. 8, 9, 10-13, 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.

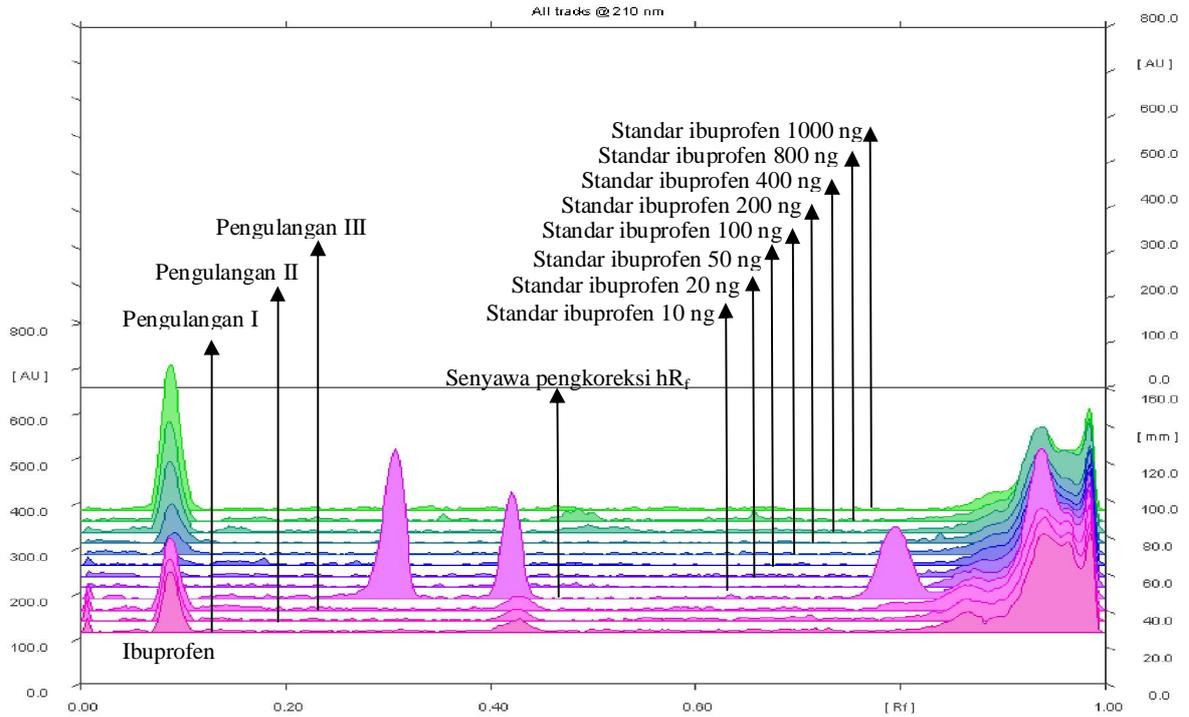
Uji Identifikasi Ibuprofen pada Obat Herbal dengan KLT-Spektrofotodensitometri (Temaje I  
G.D. B., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

---

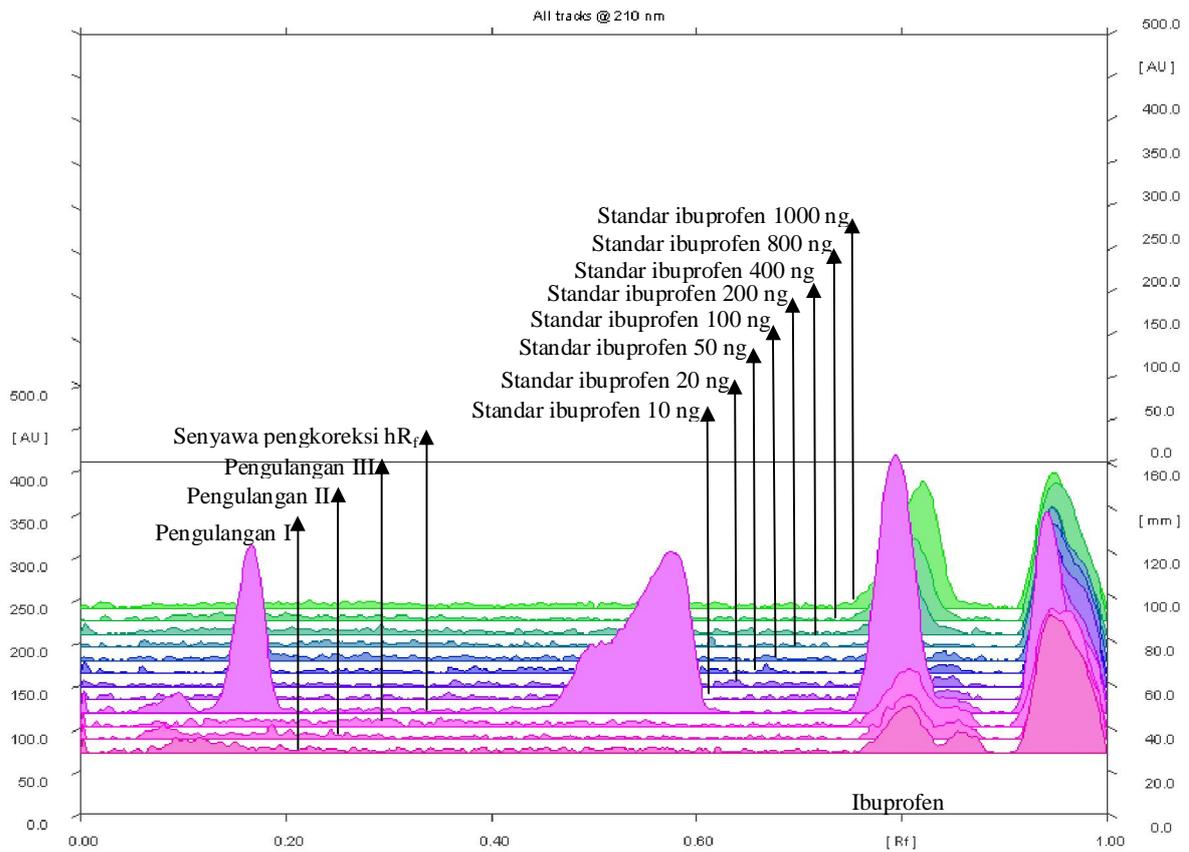
Zeeuw, R.A., J.P. Franke, F. Degel, G.  
Machbert, H. Schutz, J. Wijsbeek.  
(1992). Thin Layer Chromatographic Rf

Values of Toxicologically Relevant  
Substances on Standardized Systems.  
Jerman: VHC Verlagsgesellschaft mbH

APENDIKS A.

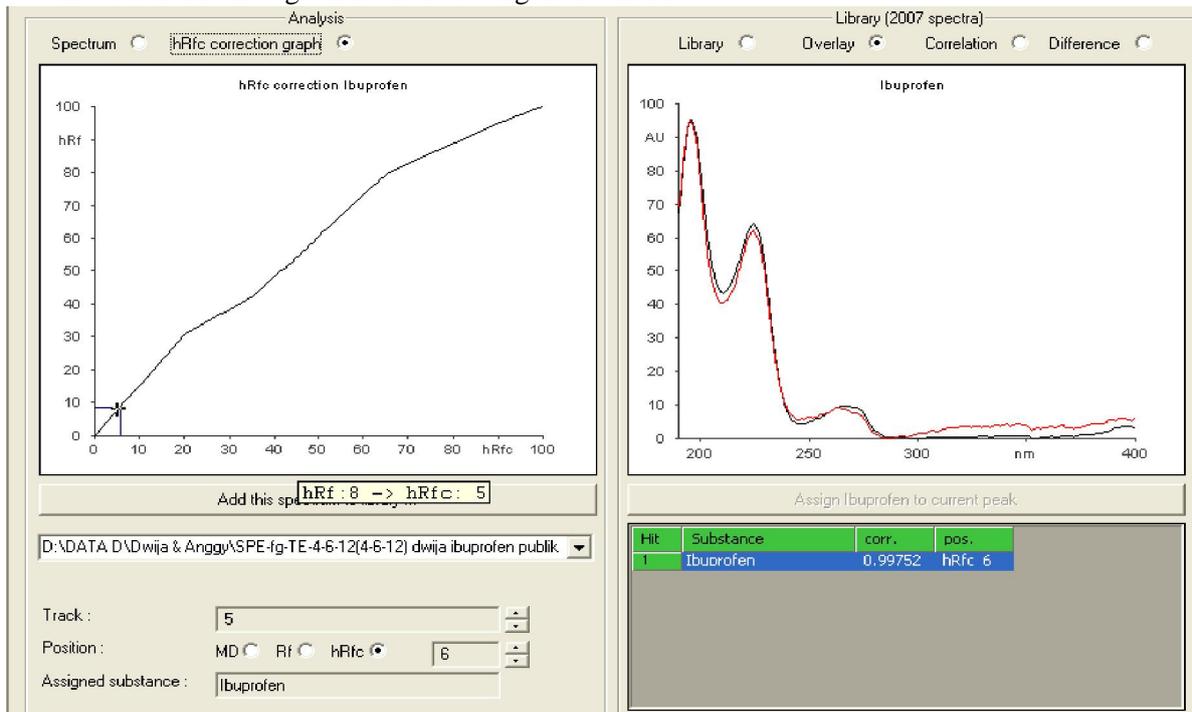


Gambar A.1. Kromatogram hasil elusi dengan sistem TE

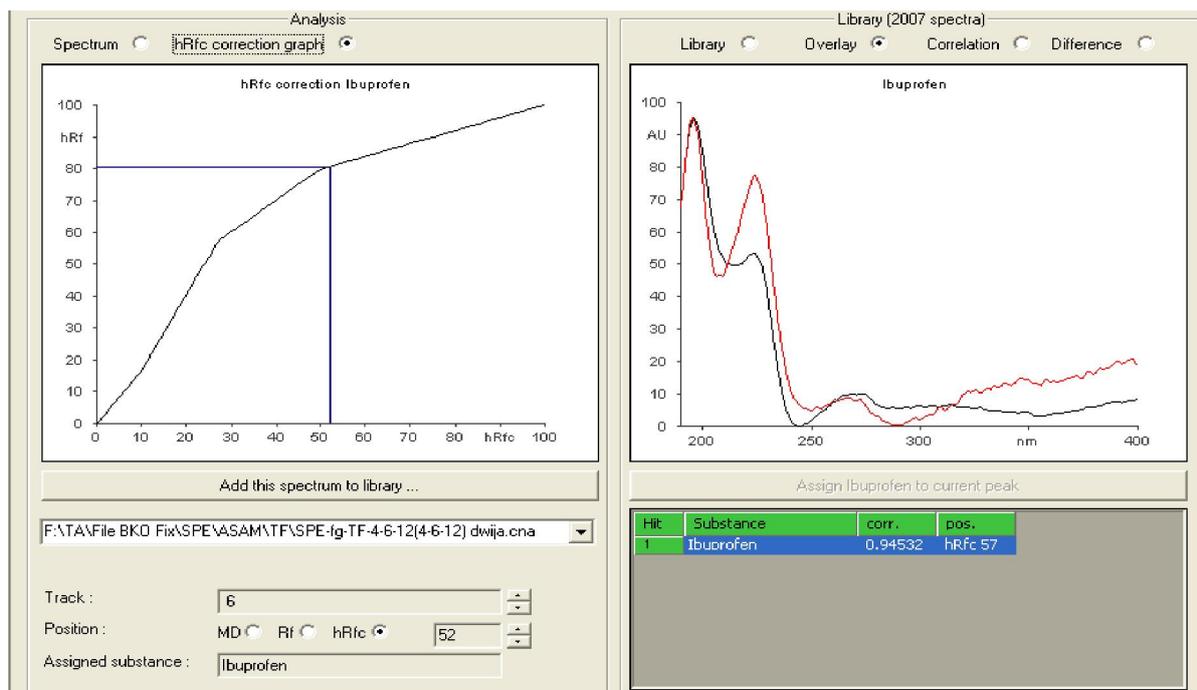


Uji Identifikasi Ibuprofen pada Obat Herbal dengan KLT-Spektrofotodensitometri (Temaje I G.D. B., I.N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

Gambar A.2. Kromatogram hasil elusi dengan sistem TF

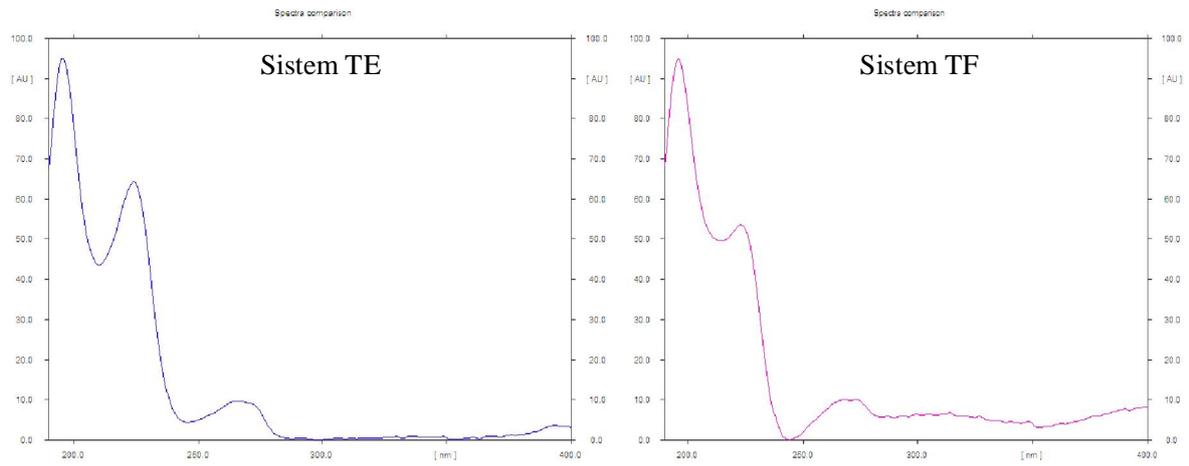


Gambar A.3. Contoh hasil koreksi  $hR_f$  dengan metode poligonal dan korelasi spektrum analit terhadap spektrum library pada sistem TE



Gambar A.4. Contoh hasil koreksi  $hR_f$  dengan metode poligonal dan korelasi spektrum analit terhadap spektrum library pada sistem TF

Uji Identifikasi Ibuprofen pada Obat Herbal dengan KLT-Spektrofotodensitometri (Temaje I  
G.D. B., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)



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

Uji Identifikasi Ibuprofen pada Obat Herbal dengan KLT-Spektrofotodensitometri (Temaje I  
G.D. B., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

APENDIKS B.

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

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

Tabel B.2. Hit factor pada sistem TE dan TF

Pengulangan	Sistem TE					Sistem TF				
	$hR_f^c$ analit	HF	Senyawa	Korelasi spektrum	Posisi	$hR_f^c$ analit	HF	Senyawa	Korelasi spektrum	Posisi
I	6	1	Ibuprofen	0,99729	$hR_f^c$ 6	52	1	Ibuprofen	0,92455	$hR_f^c$ 57
II	6	1	Ibuprofen	0,99752	$hR_f^c$ 6	52	1	Ibuprofen	0,94532	$hR_f^c$ 57
III	6	1	Ibuprofen	0,99842	$hR_f^c$ 6	52	1	Ibuprofen	0,93654	$hR_f^c$ 57

Keterangan: HF = Hit Factor; Posisi = nilai  $hR_f^c$  menurut library

Tabel B.3. Hasil identifikasi puncak pada 2 sistem KLT

Pengulangan	Sistem TE				Sistem TF			
	$hR_f^c$ analit	HF	Senyawa dengan kecocokan terbaik	Korelasi spektrum	$hR_f^c$ analit	HF	Senyawa dengan kecocokan terbaik	Korelasi spektrum
I	6	1	Ibuprofen	0,99729	52	1	Ibuprofen	0,92455
II	6	1	Ibuprofen	0,99752	52	1	Ibuprofen	0,94532
III	6	1	Ibuprofen	0,99842	52	1	Ibuprofen	0,93654

Keterangan: HF = Hit Factor

Tabel B.4. Uji purity peaks

Pengulangan	Senyawa yang ditandai	Sistem TE			Sistem TF		
		r(s,m)	r(m,e)	Kemurnian	r(s,m)	r(m,e)	Kemurnian
I	Ibuprofen	0,99983	0,99963	ok	0,99984	0,99962	ok
II	Ibuprofen	0,99987	0,99952	ok	0,99985	0,99958	ok
III	Ibuprofen	0,99984	0,99975	ok	0,99983	0,99983	ok

Keterangan: r(s,m) = korelasi spektrum  $R_f$  awal dibandingkan dengan  $R_f$  maks; r(m,e) = korelasi spektrum  $R_f$  maks dibandingkan dengan  $R_f$  akhir

Uji Identifikasi Ibuprofen pada Obat Herbal dengan KLT-Spektrofotodensitometri (Temaje I  
G.D. B., I N.K. Widjaja, K.D. Cahyadi, Gelgel W.)

Tabel B.5. Uji presisi  $hR_f$  pada sistem TE dan TF

Sistem KLT	TE	TF
Rata-rata	7	85
SD	0	1
KV	0	1,1764

Keterangan: SD = Standar Deviasi; KV = Koefisien Variansi

Tabel B.6. Uji presisi AUC pada sistem TE dan TF

Massa Penotolan (ng)	400		500		600	
	Sistem TE	Sistem TF	Sistem TE	Sistem TF	Sistem TE	Sistem TF
Rata-rata	2459,367	790	3127,467	2634,9	3755,9	3586,8
SD	41,20829	10,66583	26,50987	47,37943	17,63888	68,49095
KV	1,6755652	1,350105	0,847647	1,798149	0,469631	1,909528

Keterangan: SD = Standar Deviasi; KV = Koefisien Variansi