

# PENETAPAN KADAR Co-TRIMOKSAZOL YANG DILAKUKAN DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER ULTRAVIOLET SECARA SIMULTAN-KLT

*(Quantitative analysis of Co-Trimoxazol by Ultraviolet Spectrophotometry Simultaneously –TLC Methods)*

Jatmiko Susilo\*

## ABSTRACT

**Background:** Co-trimoxazol is an combined antibiotics consist of Sulphamethoxazol and Trimetoprim (5:1). This substance is related with tetrahydropholic acid synthesis in bacteria to produce imidine and purine. The maximum wavelength of Sulphamethoxazol at 255-257 and Trimetoprim :  $287 \pm 2$  nm may be used for concentration assay and the different of polarity properties of these substances may be separated by thin layer chromatography. **Objectives :** The objective of this research is comparing two methods, UV Spectrophotometry by Simultaneously and by TLC. **Method :** The research's methodology is experimental laboratory that comparing it's recovery weight of each substance by simultaneously – TLC method. Statistically, Analysis of variants – test and t-test are used to compare between it's standard deviations and means. **Results :** Sulphamethoxazol and Trimetoprim in Ethanol 95%-NaOH 0,1N (1:3) is show peak absorption at 257 and 289 nm wavelength. Recovery of Sulphamethoxazol is  $(98.20 \pm 0.40)$  % and Trimetoprim :  $(98.69 \pm 0.75)$  %. Statistically, the accuracy test, Sulphamethoxazol  $F_0 = 2.325 < F_{tab} (P:0,05, dbf: 9,1) = 291$ , and Trimetoprim  $F_0 = 0.126 < F_{tab} (P:0,05, dbf: 1; 7) = 5.59$ , and the precision test of Sulfametoksazol and Trimetoprim are  $t_{cal.} = 0.666 < t_{table} (P=0.05; dbt=10) = 1.81$  and  $t_{cal.} = 0.376 < t_{tab} (P:0,05, dbt: 9) = 1.83$ . **Conclusion :** Recovery of Sulphamethoxazol is  $(98.20 \pm 0.40)$  % and Trimetoprim  $(98.69 \pm 0.75)$  %. The precicion and accuration of these methods are not significantly different, Simultaneously more efficient than TLC.

**Keywords :** Co-Trimoxazol, UV Spectrophotometry Simultaneously-TLC

\*) Dosen Kimia STIKES Ngudi Waluyo Ungaran

## PENDAHULUAN

Banyaknya sediaan obat antibakteri yang beredar dengan menggunakan kombinasi bahan aktif Sulfametoksazol dan Trimetoprim (5:1), Kombinasi obat ini mempunyai keuntungan yaitu sinergi atau potensiasi bila dibandingkan dengan masing-masing penyusunnya<sup>1</sup>.

Sulfametoksazol mempunyai sifat kompetitif antagonis terhadap asam p-amino benzoate yaitu dengan menutup perubahan asam p-amino benzoate menjadi koensim asam dihidrofolat yang merupakan bentuk

tereduksi asam folat<sup>1,2</sup>, sedang Trimetoprim adalah penghambat enzim dihidrofolat reduktase yang mempengaruhi metabolisme nucleoprotein mikroorganisme dngan mengganggu system asam folat-folinat<sup>1</sup>.

Spektra ultraviolet kedua senyawa menunjukkan puncak berbeda, , yaitu 256-257 nm dalam larutan NaOH 0.1N untuk Sulfametoksazol<sup>34</sup> dan Trimetoprim dalam larutan NaOH 0,4%, didahului pelarutan dengan etanol 95%, pada  $287 \pm 2$  nm<sup>5</sup>,, sehingga dimungkinkan untuk dilakukan

penetapan kadar kedua senyawa tersebut secara simultan. Perbedaan struktur molekul dan perbedaan sifat polaritas juga dapat digunakan sebagai dasar pemisahan dengan teknik kromatografi lapis tipis<sup>3</sup> sebelum ditetapkan kadarnya. Dengan dasar perbedaan-perbedaan di atas diharapkan kombinasi Co-trimoksazol dapat ditetapkan kadarnya dengan spektrofotometer ultraviolet baik secara simultan ataupun didahului kromatografi lapis tipis.

Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk kualitatif maupun kuantitatif. Penggunaan metode untuk analisa kuantitatif didasarkan atas hukum Lambert-Beer<sup>6</sup>, yaitu

$$-\log T = A =$$

$abc$

dimana A : absorpsi atau serapan

a : absorptivitas, karakteristik untuk molekul atau ion penyerap dalam larutan

tertentu dan panjang gelombang tertentu

b : ketebalan media yang dilewati

c : kadar larutan

Bila sistem mengandung lebih dari satu komponen penyerap, ternyata bahwa spesies-spesies tersebut berkelakuan tidak tergantung satu terhadap lain dan absorbansinya adalah aditif<sup>6</sup>. Oleh karena itu, penetapan kadar lebih dari satu komponen secara simultan, digunakan rumus<sup>6,7</sup> :

$$\lambda_1 = A' = a'_1C_1 + a'_2C_2$$

$$\lambda_2 = A'' = a''_1C_1 +$$

$$a''_2C_2$$

dimana :

A' dan A'' : serapan campuran diukur pada  $\lambda_1$  dan  $\lambda_2$

$a'_1$  dan  $a''_1$  : absorptivitas zat 1 diukur pada  $\lambda_1$  dan  $\lambda_2$

$a'_2$  dan  $a''_2$  : absorptivitas zat 2 diukur pada  $\lambda_1$  dan  $\lambda_2$

$C_1$  dan  $C_2$  : kadar zat 1 dan zat 2 dalam g/l

Kromatografi merupakan teknik pemisahan tertentu, pada dasarnya kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase tetap (*stationary*) dan fase bergerak (*mobile*), pemisahan tergantung pada gerakan relatif dari dua fase ini. Dari beberapa jenis kromatografi, satu di antaranya adalah kromatografi lapis tipis (KLT)<sup>8</sup>, kromatografi jenis ini mempunyai keuntungan antara lain membutuhkan waktu yang lebih cepat dan diperoleh pemisahan yang lebih baik. Untuk identifikasi digunakan harga Rf yang didefinisikan<sup>8</sup> sebagai berikut :

Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal.

## METODE

Metode penelitian adalah experimental, dilakukan : 1). Penetapan kadar Sulfametoksazol dan Trimetoprim secara spektrofotometrik ultraviolet simultan; 2) Penetapan kadar Sulfametoksazol dan Trimetoprim secara spektrofotometrik ultraviolet -KLT; dan 3). Membandingkan ketepatan, ketelitian dan efisiensi kedua metode tersebut.

Parameter yang digunakan adalah 1). Ketepatan yaitu apabila hasil suatu seri penetapan menghasilkan nilai puklurata yang sangat dekat dengan nilai sebenarnya; 2). Ketelitian yaitu dalam suatu seri penetapan diperoleh hasil satu sama lainnya hampir sama, ketelitian berkaitan dengan ketervariansian suatu pengukuran berulang-ulang, dan dinyatakan dengan simpangan baku,  $SD^9$ , dan 3) Efisiensi yaitu berkaitan dengan keefektifan penggunaan waktu penetapan.

Data dianalisis dengan membandingkan dua nilai penyimpangan dan puklurata menggunakan Anava dan uji-t, bila harga terhitung lebih besar daripada t (tabel) pada taraf kepercayaan 95% dan DB tertentu, dikatakan ada perbedaan bermakna dan sebaliknya<sup>10</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan pelarut sangat penting artinya pada metode speltrofotometri. Pelarut

yang baik adalah pelarut yang mampu melarutkan dengan mudah obat yang ditetapkan, demikian juga tidak menyerap radiasi ultraviolet, di samping itu perlu dipikirkan kemampuan pelarut untuk mempengaruhi panjang gelombang<sup>11</sup>. Sulfametoksazol dan Trimetoprim masing-masing mempunyai sifat amfotir dan basa lemah (Trimetoprim merupakan alkaloida), maka kedua obat tersebut mudah dilarutkan dalam pelarut asam, tetapi Sulfametoksazol mempunyai gugus amina ( $-NH_2$ ) yang dalam media asam akan mudah berubah menjadi gugus ammonium yang kurang efisien sebagai auksokrom karena electron n tidak mampu berinteraksi dengan electron  $\pi$  dari cincin sehingga tidak mempunyai pengaruh terhadap stabilitas keadaan  $\pi^*$ . Demikian pula Trimetoprim mempunyai gugus amino, sehingga puncak serapan kedua obat akan muncul pada panjang gelombang hampir sama.

Dari hasil percobaan, penggunaan campuran pelarut Etanol 95%-NaOH 0,1N (1:3) merupakan pelarut yang baik karena mampu melarutkan kedua obat tersebut dengan mudah, memberikan jangkauan perbedaan  $\lambda$  maksimum yang besar, Sulfametoksazol pada 257 dan Trimetoprim 289 nm. Spektra campuran kedua obat saling tindih (*overlap*) dua jalan, sehingga serapan total merupakan addisi kedua komponen penyerap.

Larutan Sulfametoksazol dan Trimetoprim dalam campuran Etanol 95%-NaOH (1:3) menunjukkan serapan stabil selama 60 menit. Pengukuran pada  $\lambda$  257 dan

289 nm, absorptivitas Sulfametoksazol : 68.37; SD =  $\pm$  0.56 dan 10.08 ; SD =  $\pm$  0.06. Sedangkan absorptivitas Trimetoprim : 7.94 ; SD =  $\pm$  0.09. dan 25.38 ; SD =  $\pm$  0.17

Table 1 Hasil penetapan kadar Sulfametoksazol dan Trimetoprim secara spektrofotometri UV simultan pada panjang gelombang 257 dan 289 nm.

No.	Penimbangan		Serapan		Hasil	
	Sulfa (mg)	Tmp (mg)	257 nm	289 nm	% Sulfa	% Tmp
1	200.40	39.95	0.888	0.194	98.91	101.97*
2	199.93	42.24	0.889	0.196	99.19	99.23
3	200.00	40.40	0.889	0.193	99.26	98.88
4	197.49	40.11	0.875	0.190	98.94	98.13
5	200.83	41.74	0.897	0.196	99.70	98.53
6	198.71	40.70	0.914	0.198	102.73*	100.09*

\*) : tidak memenuhi uji Q

Dari data di atas, menunjukkan kadar rata-rata Sulfametoksazol adalah 99.20 % dengan SD = 0.32 dan kadar rata-rata Trimetoprim adalah 98.70 %, SD = 0.47, setelah dilakukan uji Q ternyata menunjukkan bahwa hasil prosentase nomer 6 (enam) untuk Sulfametoksazol dan Trimetoprim nomer 1 (satu) dan 6 (enam) tidak memenuhi uji Q, sehingga hasil akhir perolehan kembali penetapan kadar untuk Sulfametoksazol :  $(99.20 \pm 0.40)$  dengan SD = 0.32 dan Trimetoprim :  $(98.69 \pm 0.75)$  % dengan SD = 0.47

Dari hasil pemisahan KLT, diperoleh harga Rf Sulfametoksazol adalah 0.25 (SD : 0.0055) dan Trimetoprim 0.10 (SD: 0.0072), hal ini karena silica gel mempunyai gugus hidroksil bebas yang dapat mengadakan

ikatan hidrogen dengan elektron bebas dari gugus amino, juga bersifat asam (pH 3-5) sehingga obat yang bersifat basa cenderung diadsorpsi lebih kuat daripada obat bersifat asam atau netral, sehingga Trimetoprim akan diadsorpsi lebih kuat oleh fase diam dibanding Sulfametoksazol.

Data menunjukkan hubungan linier antara kadar Sulfametoksazol dan serapan pada panjang gelombang 257 nm,  $Y=64.6065x - 0.0062$  dengan koefisien korelasi  $r: 0.9271 > r$  tabel ( $P = 0,01; N = 6$ ) = 0.917, juga Trimetoprim pada 289 nm,  $Y= 649.2695x - 0.1206$ , koefisien korelasi,  $r = 0.9931 > r$  tabel ( $P = 0.01; N=50$ ) = 0.959.

Table 2 Hasil penetapan kadar Sulfametoksazol dan Trimetoprim secara spektrofotometri UV yang didahului dengan Kromatografi Lapis Tipis

No.	Penimbangan		Hasil Sulfa		Hasil Tmp	
	Sulfa (mg)	Tmp (mg)	A	%	A	%
1	99.77	20.43	0.097	100.11	0.089	99.21
2	100.08	19.81	0.094	96.90	0.087	101.35*
3	100.16	20.71	0.097	99.72	0.090	98.34
4	100.04	20.63	0.098	100.81	0.089	98.25
5	99.89	21.05	0.096	98.05	0.095	99.04
6	100.78	19.95	0.094	96.22	0.084	99.19

\* tidak memenuhi uji Q

Hasil perolehan kembali Sulfametoksazol dan Trimetoprim adalah  $(98,64 \pm 1.95) \% SD = 1.86$  dan  $(99.81 \pm 0.58) \% SD = 1.27$ . Metode ini kurang praktis, karena obat harus dipisahkan dan diekstraksi dari fase diam kromatografi, di samping diperlukan kecermatan tinggi dalam penanganan teknik kromatografi.

Ketelitian diuji dengan Uji-Anava, diperoleh Sulfametoksazol  $F_0 = 2.325 < F_{tab}$  ( $P:0,05, dbf: 9,1$ ) = 291, dan Trimetoprim  $F_0 = 0.126 < F_{tab}$  ( $P:0,05, dbf: 1; 7$ ) = 5.59, sedang uji ketepatan dengan uji-t Sulfametoksazol dan Trimetoprim masing-masing  $t_{hitung} = 0.666 < t_{table}$  ( $P=0.05; dbt=10$ ) = 1.81 dan  $t_{hitung} = 0.376 < t_{tab}$  ( $P:0,05, dbt: 9$ ) = 1.83. Ketelitian dan ketepatan kedua metode tidak berbeda secara bermakna. Menurut Farmakope Indonesia (1979), persyaratan batas kadar masing-masing zat aktif Sulfametoksazol tidak kurang dari 98.5% dan Trimetoprim 98.5 – 101.0 %

dan hasil menunjukkan metode spektrofotometri simultan-KLT memenuhi syarat yang ditetapkan.

#### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kadar perolehan kembali Sulfametoksazol dan Trimetoprim dalam Co-trimoksazol Metode spektrofotometri UV simultan adalah :  $(99.20 \pm 0.40)\%$  dan  $(98,64 \pm 1.95) \%$  dan KLT :  $98.69 \pm 0.75 \%$  dan  $(98.81 \pm 0.58) \%$ . Ketelitian dan ketepatan kedua metode tidak berbeda secara bermakna dan cara simultan lebih efisien dibanding KLT.

#### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan metode lain dan membandingkannya dengan metode ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Reynold, E.F. and Prasad, A.B., Martindale, The Pharmacopoeia, 28<sup>th</sup> Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1982 : 1457-1461.
2. Goodman, L.S. and Gilman, A., The Pharmacological Basic of Therapeutics, 6<sup>th</sup> Ed., Mc Millan Publishing, Co., Inc., New York, Toronto, London, 1980 : 1048-1049, 1106-1108.
3. Anonim, Farmakope Indonesia, Ed. III, Departemen Kesehatan R.I., Jakarta, 1979 : 586-587, 613-615.
4. Rudy, B.C. and Senkowski, B.Z., Analytical Profiles of Drugs Substances, (Florey, K., ed.), vol.2, Academic Press, New York, London, 1973 : 469-485.
5. Manius, G.j., Analytical Profiles of Drugs Substances, (Florey, K., ed.), vol.7, Academic Press, New York, London, 1978 : 447-471.
6. Hardjono, S. dan Sri Noegrohati, Spektroskopi Ultraviolet dan Terlihat, Lab. Analisa Kimia/Fisika Pusat, UGM, Yogyakarta, 14-17.
7. Connors, K.A., A Textbook of Pharmaceutical Analysis, 2<sup>nd</sup> Ed., A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 1975 : 184.
8. Hardjono, S., Kromatografi, Lab. Analisa Kimia/Fisika Pusat, UGM, Yogyakarta, 1983 : 36-37.
9. Achmad, M. F., dan Achmad, M., Volumetri dan Gravimetri, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 1982 : 19-26.
10. Achmad, M., Statistika Farmasi dan Biologi, Ghalian Indonesia, Yogyakarta, 1985 : 57-71.
11. Pavia, D. L. Lampman, G. M., and Kriz, G. Z., Intrduction to Spectroscopy, A Guide for student of Organic Chemistry, Saunders Golden Sumburt Series, Saunders College, Philadelphia, 1979 : 187-188.