

**PENGEMBANGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI PADA PENETAPAN KADAR
FLUKONAZOL PADA SEDIAAN KAPSUL**

PENELITIAN TUGAS AKHIR

Andy Teguh Purwanto

12151002



**UNIVERSITAS BHAKTI KENCANA
FAKULTAS FARMASI
PROGRAM STUDI STRATA I FARMASI
BANDUNG**

2019

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGEMBANGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI PADA PENETAPAN KADAR
FLUKONAZOL PADA SEDIAAN KAPSUL**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu

Disusun Oleh:

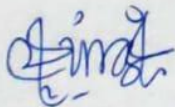
Andy Teguh Purwanto

12151002

Bandung, 17 Juni 2019

Menyetujui,

Pembimbing Utama



(Winasih Rachmawati, M.Si., Apt.)

Pembimbing Serta



(Emma Emawati, M.Si., Apt)

ABSTRAK

**PENGEMBANGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI PADA PENETAPAN KADAR
FLUKONAZOL PADA SEDIAAN KAPSUL**

Oleh :

ANDY TEGUH PURWANTO

12151002

Kapsul flukonazol merupakan salah satu antifungi golongan triazol yang bekerja menghambat sintesis ergosterol sehingga menghambat pertumbuhan jamur. Obat ini berspektrum antifungal luas dan efektif pada pemberian per oral. Penetapan kadar flukonazol kapsul dalam *Indian Pharmacopeia* tahun 2010 ditentukan secara KCKT menggunakan fase gerak campuran larutan penyangga phospat dan Metanol (60:40) dengan waktu tambat 7 menit. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan optimasi dan validasi metode KCKT pada penetapan kadar flukonazol dalam sediaan kapsul. Selanjutnya metode yang tervalidasi ini diaplikasikan pada penetapan kadar kapsul flukonazol. Penetapan kadar flukonazol dalam kapsul dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) menggunakan kolom Shimadzu TSKgel C18 5 μ m (4,6x 250mm) dengan perbandingan fase gerak larutan penyangga pH 3,6 : metanol (40:60), laju air 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 261 nm. Hasil identifikasi flukonazol diperoleh waktu retensi flukonazol dalam sediaan kapsul sama dengan waktu retensi flukonazol baku yaitu pada 4,3 menit. Hasil penelitian diperoleh kadar Kapsul A = 96,06% \pm 0,21%, kapsul B = 93,28% \pm 1,1%. Hasil yang diperoleh ini memenuhi persyaratan yang tercantum dalam *Indian Pharmacopeia* tahun 2010, yaitu mengandung flukonazol tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Kata Kunci : Flukonazol, Kapsul, KCKT, Pengembangan.

ABSTRACT

DEVELOPMENT HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD OF ANALYSIS FOR FLUCONAZOLE IN CAPSULE

ANDY TEGUH PURWANTO

12151002

Fluconazole capsule is a triazole antifungal drug which acts by inhibition of the ergosterol component of the fungal cell membrane which inhibits fungal growth. It is active against a broad spectrum fungal pathogens and is available for oral use. Determination of fluconazole capsule in Indian Pharmacopeia Edition 2010 confirmed by HPLC using mobile phase of buffer phospat and methanol (60:40) with runtime 7 minutes. The purpose of this study is to optimate and validate HPLC method in determining fluconazole capsule. Determination of Fluconazole contents in capsules was perfomed on Reversed Phase High Peformance Liquid Chromatography system TSKgel C18 5u (250 x 4.6 mm) (Shimadzu) using a mobile phase of methanol and buffer phospat (60 : 40 v/v) with flow rate 1.0 ml/min at 261 nm detector wave length. The identification results esthablished in similar retention time between Fluconazole capsule dosage form and Fluconazole reference standard at 4.3 minute. The results showed contents of generic capsule A = 96,06% \pm 0.21%, and the contents of capsule B = 93,28% \pm 1,14. The results showed the contents of generic and brand capsules of Fluconazoles are accepted in requirement of fluconazole pharmacy dosage form levels specified in Indian pharmacopeia Edition 2010 which contains not less than 90,0% and not more than 110,0% of the labeled amount.

Keywords : capsule, development, fluconazole, HPLC.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat Rahmat dan Karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan penelitian Tugas Akhir dengan judul “Pengembangan Metode Kromatografi cair tingkat tinggi Pada Penetapan Kadar Flukonazol Pada Sediaan Kapsul”.

Penulisan penelitian Tugas Akhir ini diajukan untuk memenuhi persyaratan Tugas Akhir II program studi Strata I Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Bandung. Dalam penyusunan penelitian Tugas Akhir ini tidak lepas dari hambatan dan kesulitan, namun berkat bimbingan, bantuan, nasihat dan saran serta kerjasama dari berbagai pihak, khususnya pembimbing, segala hambatan tersebut akhirnya dapat diatasi dengan baik.

Penulis menyadari bahwa penyusunan penelitian Tugas Akhir ini jauh dari sempurna sehingga penulis membutuhkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Selanjutnya dalam penyusunan penelitian Tugas Akhir ini penulis banyak diberi bantuan oleh berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus hati mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Winasih Rachmawati, M.Si., Apt. sebagai pembimbing I atas bimbingan, arahan, saran dan motivasi yang diberikan.
2. Emma Emawati, M.Si sebagai pembimbing II atas bimbingan, arahan, saran dan motivasi yang diberikan.

3. Peneliti Metode Analisis PT Kimia Farma bapak Gumilang adi Ramadan, S.Farm., Apt atas bimbingan, arahan dan saran yang diberikan.
4. Orang tua tercinta yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materil.
5. Teman-teman kerja di PT Kimia Farma Rnd Sandi nugraha, M.Khairul Ridwan, dan teman – teman para analisis yang tidak bisa disebut satu per satu.
6. Indah Rahmawati yang selalu memberikan semangat dan dukungan selama ini.
7. Sahabat, member Wacana Lumpat dan teman-teman seperjuangan di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
8. Berbagai pihak yang telah memberikan bantuan dan dorongan pada proses penyusunan penelitian Tugas Akhir ini.

Akhir kata, semoga penelitian Tugas Akhir ini bermanfaat, khususnya bagi penulis dan umumnya bagi kita semua dalam rangka menambah wawasan pengetahuan dan pemikiran kita.

Bandung, Juni 2019

penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	V
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1. Latar Belakang	1
I.2. Rumusan Masalah	3
I.3. Tujuan Penelitian.....	3
I.4. Manfaat Penelitian.....	4
I.5. Waktu dan Tempat Penelitian	4
Bab II Tinjauan Pustaka	5
II.1 Antifungi.....	5
II.2 Flukonazol	7
II.3 Kromatografi cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	9
II.3.1 Keuntungan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)..	9
II.3.2 Jenis-jenis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	10
II.3.3 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .	11
II.3.4 Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	15
II.4 Validasi Metode Analisa	17
II.4.1 Parameter-Parameter Validasi Metode Analisis.....	18

II.4.2 Uji Kesesuaian Sitem	24
Bab III Metodologi Penelitian	29
Bab IV Alat Dan Bahan.....	30
Bab V Prosedur Kerja.....	31
V.1 Pembuatan Larutan Penyangga pH 3,6	31
V.2 Pembuatan Larutan Induk	31
V.3 Optimasi Kondisi Analisis KCKT	31
V.4 Uji Kesesuaian Sistem	32
V.5 Validasi Metode Analisis	32
V.6 Penetapan Kadar Sampel	34
Bab VI Hasil dan Pembahasan	35
VI.1. Optimasi Kondisi Analisis.....	35
VI.2. Uji Kesesuaian Sistem	37
VI.3. Validasi Metode Analisis	38
VI.4. Penetapan Kadar Sampel.....	42
Bab VII Kesimpulan dan Saran	45
VII.1. Kesimpulan	45
VII.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN	49

Bab I Pendahuluan

I.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan sebuah negara yang berada di titik katulistiwa dan merupakan negara dengan iklim tropis, dimana Negara tropis memiliki kelembapan yang tinggi. Dengan adanya kelembapan yang tinggi jamur sangatlah mudah menginfeksi dan menyebar. Infeksi karena jamur biasanya terjadi pada kulit atau mukosa: lokal atau superfisial namun, di negara-negara dengan defisiensi imun seperti Indonesia, organ internal juga mungkin terinfeksi mikosis sistemik. Mikosis paling sering karena dermatofita, yang mempengaruhi kulit, rambut, dan kuku setelah infeksi eksternal, dan *Candida albicans*, organisme ragi yang biasanya ditemukan pada permukaan tubuh, yang dapat menyebabkan infeksi pada membran mukosa, dan jarang pada kulit atau organ internal ketika pertahanan alami terganggu (imunopresi, atau kerusakan mikroflora oleh antibiotik spektrum luas) (Luellmann, 2005). Beberapa pengobatan telah diketahui dalam literatur seperti miconazole, ticonazole, dan nystatin untuk jenis sediaan topikal sedangkan untuk jenis sediaan oral terdapat flukonazol (Dipiro, dkk, 2008).

Flukonazol merupakan antifungal golongan triazol yang bekerja menghambat sintesis ergosterol, yaitu komponen utama pembentukan membrane sel jamur dan efektif terhadap candidiasis mulut, kerongkongan, dan vagina. (Tan dan Rahardja, 2007). Bentuk sediaan flukonazol yang paling populer digunakan yaitu bentuk sediaan kapsul. Flukonazol merupakan salah satu antifungi golongan

triazol yang bekerja menghambat sintesis ergosterol sehingga menghambat pertumbuhan jamur. Obat ini berspektrum antifungal luas dan efektif pada pemberian per oral.

Dengan semakin banyaknya penggunaan flukonazol dalam sediaan kapsul akan menjadi tantangan bagi para peneliti untuk melakukan analisis kadar dalam sediaan kapsul tersebut. Metode untuk analisis kuantitatif senyawa aktif dalam sediaan farmasi kapsul cukup beragam oleh sebab itu dibutuhkan metode yang ekonomis namun akurat dalam analisa. Optimasi metode ini memiliki tujuan untuk menyediakan suatu proses yang sederhana, cepat, dan mudah, dan harus memenuhi kriteria penerimaan validasi menurut Indian Farmakope. Validasi metode analitik adalah proses yang ditetapkan melalui penelitian laboratorium bahwa karakteristik kinerja dari metode ini memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya (BPOM, 2014). Memilih teknik analisis yang tepat untuk analisis Pada suatu pengembangan atau optimasi prosedur analisis yang menggunakan metode analisis tertentu harus dilakukan pengkajian, penilaian dan pemilihan teknik analisis yang tepat, dengan dukungan pengetahuan dan instrument yang tersedia dilaboratorium (Kosasih, 2004). Oleh karena itu sebelum metode analisis tersebut digunakan untuk pengujian analisa rutin maka dilakukan validasi metode terhadap metode analisa tersebut. Parameter dalam validasi metode termasuk spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantitasi, dan jangkauan (Harmita, 2004). Beberapa metode analisis telah dilaporkan untuk melakukan penentuan flukonazol dalam berbagai macam produk farmasi. Beberapa metode analisis untuk penentuan kadar

menggunakan KCKT Correa, et al. (2012), Menurut Sadasivudu, et al. (2009), Spektrofotometri UV menurut Sadasivudu, et al. (2009), LC-MS/MS menurut Farczadi, et al. (2016).

Berdasarkan uraian diatas penulis tertarik melakukan pengembangan dan validasi metode KCKT dengan kolom inertsil ODS-100v (4,6 mm x 250 mm) menggunakan fasa gerak campuran larutan penyangga pH 3,6-Metanol dengan sistem perbandingan tertentu, laju alir 1 ml/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 261 nm pada penetapan kadar flukonazol dalam sediaan kapsul. Metode yang telah di validasi tersebut selanjutnya digunakan dalam penetapan kadar flukonazol kapsul generik yang beredar dipasaran. Adapun parameter Validasi yang di lakukan meliputi uji akurasi, presisi, batas deteksi (BD), dan batas kuantitasi (BK), dan uji ketahanan.

I.2. Rumusan Masalah

1. Apakah metode KCKT menggunakan fase gerak larutan penyangga phospat: metanol dengan perbandingan tertentu dapat memberikan hasil uji validasi metode yang memenuhi syarat?
2. Apakah pengembangan metode tersebut dapat menghasilkan waktu tambat yang lebih cepat?

I.3. Tujuan Penelitian

1. Melakukan pengembangan metode dan uji validasi untuk fluknazol kapsul menggunakan metode KCKT.
2. Mendapatkan waktu tambat sistem KCKT yang lebih cepat.

I.4. Manfaat Penelitian

Dapat menjadi metode alternatif bagi industri farmasi pada penetapan kadar flukonazol dalam sediaan kapsul yang mengandung flukonazol dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi.

I.5. Waktu dan Tempat Penelitian

Tugas akhir ini dilakukan di Laboratorium Kimia PT Kimia Farma (persero) Tbk unit *Reasearch and Development* di jalan Cihampelas No. 45 Kota Bandung mulai bulan Oktober 2018 sampai Juli 2019.

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Antifungi

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan adanya interaksi antara agen atau faktor penyebab penyakit, manusia sebagai pejamu atau host dan faktor lingkungan yang mendukung. Agen sebagai faktor penyebab penyakit dapat berupa agen dari unsur hidup seperti virus, bakteri, jamur, parasit, dan protozoa, agen dari unsur mati seperti sinar radioaktif, karbon monoksida, pestisida, tekanan, benturan, dan lain - lain (Budiarto dan Anggraeni, 2003).

Antifungi/antimikroba adalah suatu bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme. Pemakaian bahan antimikroba merupakan suatu usaha untuk mengendalikan bakteri maupun jamur, yaitu segala kegiatan yang dapat menghambat, membasmi, atau menyingkirkan mikroorganisme. Tujuan utama pengendalian mikroorganisme untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan dan perusakan oleh mikroorganisme. Ada beberapa hal yang harus dipenuhi oleh suatu bahan antimikroba, seperti mampu mematikan mikroorganisme, mudah larut dan bersifat stabil, tidak bersifat racun bagi manusia dan hewan, tidak bergabung dengan bahan organik, efektif pada suhu kamar dan suhu tubuh, tidak menimbulkan karat dan warna, berkemampuan menghilangkan bau yang kurang sedap, murah dan mudah didapat (Pelczar & Chan, 1988).

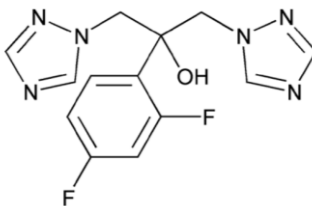
Antimikroba menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara bakteriostatik atau bakterisida. Hambatan ini terjadi sebagai akibat gangguan reaksi yang esensial untuk pertumbuhan. Reaksi tersebut merupakan satu-satunya jalan untuk mensintesis makromolekul seperti protein atau asam nukleat, sintesis struktur sel seperti dinding sel atau membran sel dan sebagainya. Antibiotik tertentu dapat menghambat beberapa reaksi, reaksi tersebut ada yang esensial untuk pertumbuhan dan ada yang kurang esensial (Suwandi 1992).

Mekanisme antijamur dapat dikelompokkan sebagai gangguan pada membran sel, gangguan ini terjadi karena adanya ergosterol dalam sel jamur, ini adalah komponen sterol yang sangat penting sangat mudah diserang oleh antibiotik turunan polien. Kompleks polien-ergosterol yang terjadi dapat membentuk suatu pori dan melalui pori tersebut konstituen esensial sel jamur seperti ion K, fosfat anorganik, asam karboksilat, asam amino dan ester fosfat bocor keluar hingga menyebabkan kematian sel jamur. Penghambatan biosintesis ergosterol dalam sel jamur, mekanisme ini merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan imidazol karena mampu menimbulkan ketidakteraturan membran sitoplasma jamur dengan cara mengubah permeabilitas membran dan mengubah fungsi membran dalam proses pengangkutan senyawa – senyawa esensial yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolik sehingga menghambat pertumbuhan atau menimbulkan kematian sel jamur (Sholichah 2010).

Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein jamur, merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan pirimidin. Efek antijamur terjadi karena senyawa turunan pirimidin mampu mengalami metabolisme dalam sel jamur menjadi suatu antimetabolit. Metabolik antagonis tersebut kemudian bergabung dengan asam ribonukleat dan kemudian menghambat sintesis asam nukleat dan protein jamur. Penghambatan mitosis jamur, efek antijamur ini terjadi karena adanya senyawa antibiotik griseofulvin yang mampu mengikat protein mikrotubuli dalam sel, kemudian merusak struktur *spindle mitotic* dan menghentikan metafasa pembelahan sel jamur (Sholichah 2010).

II.2 Flukonazol

Sifat fisikokimia menurut British Phacopoeia (2013) adalah



Gambar II. 1. Struktur Flukonazol

Nama Kimia	: 2-(2,4-Difluorophenyl)-1,3-bis(1 <i>H</i> ,2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol.
Rumus Molekul	: C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O
Berat Molekul	: 306,3
Pemerian	: Putih, hampir putih, bubuk kristal higroskopis.
Kelarutan	: Sedikit larut dalam air, mudah larut dalam metanol, larut dalam aseton.

Farmakologi

Flukonazol termasuk golongan antifungi golongan triazol yang bekerja menghambat sintesis ergosterol pada membran sel jamur. Flukonazol diberikan peroral absorpsinya baik dan tidak bergantung pada keasaman lambung. Waktu paruh obat berkisar pada 30 jam dengan ikatan obat pada protein plasma rendah dan obat ini terdistribusi merata dalam cairan tubuh. Flukonazol diberikan pada penderita candidiasis mulut, kerongkongan dan vagina. Flukonazol berguna untuk mencegah relaps meningitis yang disebabkan oleh *Cryptococcus* pada pasien AIDS (Setiabudi dan Bahry, 2007).

Bentuk Sediaan

Kapsul 50 mg, 100 mg, 150 mg, dan 200 mg; tablet 50 mg, 150 mg, dan 200 mg (Anonim, 2010). Flukonazol tersedia untuk pemakaian sistemik (IV) dalam formula yang mengandung 2 mg/ml dan untuk pemakaian oral dalam kapsul yang mengandung 50, 100, 150, 200 mg. Di Indonesia, yang tersedia adalah sediaan 50 dan 150 mg (Setiabudi dan Bahry, 2007).

II.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah suatu teknik pemisahan dengan menggunakan padatan sebagai fase diam (*stationary phase*) dan cairan sebagai fase gerak (*mobile phase*). KCKT menjadi teknik pemisahan yang luas digunakan untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel baik di bidang farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri makanan (Gandjar, 2012).

KCKT digunakan untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*), analisis senyawa tidak menguap (*non - volatil*), penentuan molekul netral, ionik, maupun zwitter ion, isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa dengan struktur hampir sama, pemisahan senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala industri. Metode KCKT tidak bersifat destruktif sehingga cocok untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar, 2012).

II.3.1 Keuntungan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Sebagai metode analisis modern, KCKT memiliki banyak kelebihan antara lain :

1. Cepat, waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam. Banyak analisis yang dapat diselesaikan sekitar 15 –30 menit. Untuk analisis yang tidak rumit (*uncomplicated*), waktu analisis dapat dicapai dalam waktu kurang dari 5 menit.

2. Resolusi, kemampuan zat padat berinteraksi secara spesifik dengan fase diam dan fase gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.
3. Sensitivitas detektor, detektor UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam - macam zat.
4. Kolom dapat digunakan kembali (*reusable*)
5. Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik
6. Mudah *recovery* sampel, umumnya detektor yang digunakan pada KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa. Oleh karena itu, komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor (Putra, 2004)

II.3.2 Jenis-jenis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pemisahan dalam KCKT dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, sering kali KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Meskipun demikian, klasifikasi berdasarkan pada sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme sorpsi solut memberikan suatu jenis KCKT yang lebih spesifik. Terdapat tiga bentuk KCKT yang sering digunakan yaitu penukar ion, partisi, dan adsorpsi (Gandjar, 2012).

Kromatografi penukar ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Penukar ion yang paling luas penggunaannya adalah polistiren resin. Kebanyakan

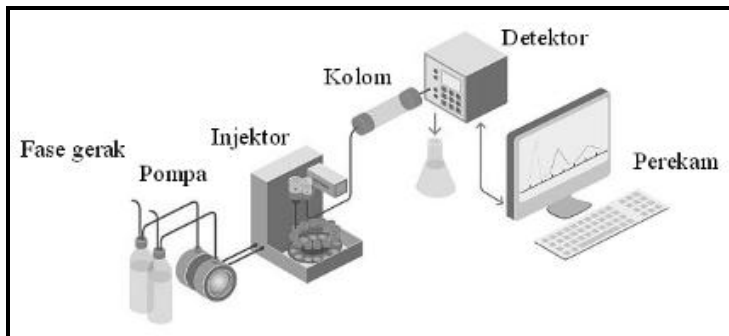
pemisahan kromatografi ion dilakukan dengan menggunakan media air. Jenis ion dalam fase gerak dapat berpengaruh secara nyata pada retensi solut sebagai akibat dari perbedaan kemampuan ion fase gerak berinteraksi dengan resin penukar ion (Gandjar, 2012).

Kromatografi partisi atau disebut juga sebagai kromatografi fase terikat menggunakan fase gerak dan fase diam dengan kepolaran berbeda. Kebanyakan fase diam adalah silika yang dimodifikasi secara kimiawi. Fase diam yang populer digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C18) dan kebanyakan pemisahannya adalah fase terbalik. Sebagai fase gerak adalah campuran metanol dan asetonitril dengan air atau dengan larutan bufer (Gandjar, 2012).

Kromatografi adsorpsi kurang luas penggunaannya, meskipun demikian jenis kromatografi ini sesuai untuk pemisahan-pemisahan campuran isomer struktur dan untuk pemisahan solut dengan gugus fungsional yang berbeda. Pemisahan biasanya menggunakan fase normal dengan menggunakan fase diam silika gel dan alumina. Sedangkan fase gerak yang digunakan berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek (Gandjar, 2012).

II.3.3 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung dan suatu komputer atau perekam (Gandjar, 2012).



Gambar II. 2. Instrumen KCKT

1. Wadah Fase Gerak (*Reservoir*)

Wadah fase gerak menyimpan sejumlah fase gerak yang secara langsung berhubungan dengan sistem. Wadah haruslah bersih dan inert, seperti botol pereaksi kosong maupun labu gelas. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Gandjar, 2012).

2. Pompa (*Pump*)

Pompa digunakan untuk mengalirkan fase gerak menuju kolom. Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar, 2012).

Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (*constant pressure*) dan pemindahan konstan (*constant displacement*).

Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua yaitu pompa *reciprocating* dan pompa *syringe*. Pompa *reciprocating* menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur, sehingga memerlukan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar (*base line*) detektor yang stabil. Keuntungan dari pompa *reciprocating* ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Keuntungan dari pompa *syringe* adalah memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (Putra, 2004).

Pompa yang digunakan dalam KCKT harus inert dengan fase geraknya. Bahan yang umum digunakan untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, Teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (Gandjar, 2012).

3. Injektor (*Injector*)

Injektor berfungsi untuk memasukan sampel. Sampel-sampel cair dan larutan disuntikan melalui injektor secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom. Injektor terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal dan eksternal. Kelebihan pengisian sampel ini akan dikeluarkan ke pembuang (Gandjar, 2012).

4. Kolom (*Column*)

Kolom umumnya dibuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan pada temperatur tinggi. Ada dua kelompok kolom yaitu:

a. Kolom analitik

Diameter dalam 2 –6 mm, panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan pellicular, panjang yang digunakan adalah 50 –100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikular 10 –30 cm.

b. Kolom preparatif

Umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25 – 100 cm. Panjang kolom bervariasi dari 15-150 cm. Pengisi kolom biasanya adalah silica gel alumina, dan elit. Pengisi kolom seperti partikel pellicular, yaitu butiran gelas yang dilapisi dengan materi berpori (Putra, 2004).

5. Detektor (*Detector*)

Detektor digunakan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif) (Putra, 2004). Idealnya, detektor memiliki karakteristik sebagai berikut:

- a. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduisibel.
- b. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil.
- c. Stabil dalam pengoperasian.
- d. Mempunyai sel volume yang keciln sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.

- e. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier).
- f. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak (Gandjar, 2012)

Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan range yang luas. Detektor - detektor lain antara lain:

- a. Detektor fluorometer
- b. Detektor ionisasi nyala
- c. Detektor elektrokimia
- d. Detektor spektrofotometer massa
- e. Detektor refraksi indeks
- f. Detektor reaksi kimia (Putra, 2004).

II.3.4 Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Dalam sistem KCKT terdapat dua fase yaitu fase gerak dan fase diam.

1. Fase Gerak

Fase gerak merupakan suatu variabel yang memengaruhi pemisahan.

Fase gerak yang baik harus memiliki sifat -sifat antara lain:

- a. Murni, tidak terdapat kontaminan.
- b. Tidak bereaksi dengan wadah.
- c. Sesuai dengan detektor.
- d. Melarutkan sampel
- e. Memiliki viscositas rendah.
- f. Memudahkan “*sample recovery*”

g. Diperdagangkan, dapat diperoleh dengan harga murah (*reasonable price*)

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen sampel (Gandjar, 2012).

Berdasarkan kepolaran fase gerak dan fase diam, KCKT dibagi menjadi:

a. Fase Normal

Kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase gerak yang sering digunakan adalah campuran pelarut - pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorasi atau menggunakan pelarut - pelarut jenis alkohol. Pemisahan menggunakan fase normal kurang umum digunakan.

b. Fase Terbalik

Kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase gerak yang umum digunakan adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril . Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara gradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi). Elusi gradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas (Gandjar, 2012).

2. Fase Diam

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer - polimer stiren dan divinil benzene. Permukaan silica adalah polar dan sedikit asam karena adanya gugus silanol (Si - OH) (Gandjar, 2012).

Oktadesil silica (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah sedang maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi sesuai untuk solut yang polar. Silika - silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan (Gandjar, 2012).

II.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis menurut Farmakope Indonesia Edisi V merupakan proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja prosedur tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Validasi metode analisis menurut *United States Pharmacopeia (USP)* dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Gandjar, 2012).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk

mengatasi masalah analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika:

1. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu.
2. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
3. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
4. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
5. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku (Gandjar, 2012).

II.4.1 Parameter-Parameter Validasi Metode Analisis

Parameter - parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*) dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2008).

1. Ketepatan (Akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar terukur}}{\text{Kadar teoritis}} \times 100\%$$

Untuk pengujian senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (standard reference material, SRM). Suatu metode dikatakan tepat jika ia menghasilkan hasil yang sama dalam sederet penentuan ulangan (Gandjar, 2012).

2. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Sesuai dengan ICH (*International Conference on Harmonization*), presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu: keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*).

- a. Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- b. Presisi antara yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- c. Ketertiruan merujuk pada hasil - hasil dari laboratorium yang lain.

Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relatif (SBR) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan. Pengujian presisi pada saat awal validasi

metode seringkali hanya menggunakan dua parameter yang pertama, yaitu: keterulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali diekspresikan dengan SB atau standar deviasi relatif (SBR) dari serangkaian data (Gandjar, 2012).

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \%$$

Keterangan:

RSD = SBR = Relatif Standar Deviasi / Simpangan Baku Relatif

SB = SD = Standar Deviasi / Simpangan Baku

\bar{X} = Kadar rata-rata sampel

Data untuk menguji presisi seringkali dikumpulkan sebagai bagian kajian - kajian lain yang berkaitan dengan presisi seperti linearitas atau akurasi. Biasanya replikasi 6-15 dilakukan pada sampel tunggal untuk tiap-tiap konsentrasi. Pada pengujian dengan KCKT, nilai SBR antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak; sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, SBR berkisar antara 5-15% (Gandjar, 2012).

3. Batas Deteksi (BD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. BD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang

memberikan respon sebesar respon blangko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blangko ($3S_b$) (Gandjar, 2012).

BD seringkali diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) yang biasanya rasionya 2 atau 3 dibanding 1. ICH mengenalkan suatu konversi metode *signal to noise ratio* ini, meskipun demikian BD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SB) respon dan kemiringan (slope, S) kurva baku pada level yang mendekati BD sesuai dengan rumus, $BD = 3 (SB/S)$.

$$BD = \frac{3 \times \left(\frac{Sy}{x}\right)}{\text{Slope (Kemiringan)}}$$

Untuk menghitung Standar Deviasi (SB) dengan rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Keterangan :

SD = SB = Standar Deviasi / Simpangan Baku

X = Kadar sampel

\bar{X} = Kadar rata-rata sampel

n = Jumlah perlakuan

Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Gandjar, 2012).

4. Batas Kuantitasi (BK)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana BD, BK juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). Kadang-kadang rasio *signal to noise* 10:1 digunakan untuk menentukan BK. Perhitungan BK dengan rasio *signal to noise* 10:1 merupakan aturan umum, meskipun demikian perlu diingat bahwa BK merupakan suatu kompromi antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jadi, jika konsentrasi BK menurun maka presisi juga menurun. Jika presisi tinggi dipersyaratkan, maka konsentrasi BK yang lebih tinggi harus dilaporkan (Gandjar, 2012).

ICH mengenalkan metode rasio *signal to noise* ini, meskipun demikian sebagaimana dalam perhitungan BD, ICH juga menggunakan dua metode pilihan lain untuk menentukan BK yaitu metode non instrumental visual dan metode perhitungan. Sekali lagi, metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SB) dan slope (S) kurva baku sesuai rumus $BK = 10 (SB/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi (Gandjar, 2012).

$$BK = \frac{10 \times \left(\frac{Sy}{x}\right)}{\text{Slope (Kemiringan)}}$$

5. Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil - hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Gandjar, 2012).

6. Rentang

Rentang atau kisaran suatu metode didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang mencukupi. Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya (Gandjar dan Rohman, 2007).

7. Kekuatan

Kekuatan/ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya. Suatu praktek yang baik untuk mengevaluasi ketahanan suatu metode adalah dengan memvariasi parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan (Gandjar dan Rohman, 2007).

II.4.2 Uji Kesesuaian Sistem

Seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah dilakukan pengembangan metode dan validasi metode (Gandjar, 2012).

Uji kesesuaian sistem adalah bagian integral dari metode kromatografi cair dan kromatografi gas. Uji ini digunakan untuk verifikasi bahwa sistem kromatografi memadai untuk analisis tersebut. Adapun parameter-parameternya antara lain: Jumlah lempeng teoritis (N), Efisiensi Kolom, Faktor kapasitas (k'), Faktor Asimetris (Tf) (Menkes RI, 2014).

1. Tinggi dan Luas puncak

Tinggi dan luas puncak berkaitan secara proporsional dengan kadar atau jumlah analit tertentu yang terdapat dalam sampel (memiliki informasi kuantitatif). Namun demikian, luas puncak lebih umum digunakan dalam perhitungan kuantitatif karena lebih akurat/cermat daripada perhitungan menggunakan tinggi puncak (Dong, 2005). Hal ini dikarenakan luas puncak relative tidak banyak dipengaruhi oleh kondisi kromatografi, kecuali laju alir. Sementara itu, tinggi puncak dipengaruhi oleh banyak faktor seperti misalnya faktor tambat, suhu kolom serta cara injeksi sampel (Miller, 2005). Hal ini akan menyebabkan tinggi puncak relatif labil selama analisis. Namun

demikian tinggi puncak masih dapat digunakan dalam perhitungan kuantitatif bila puncak analit simetris (Meyer, 2004).

2. Waktu Tambat

Periode waktu antara penyuntikan sampel dan puncak maksimum yang terekam oleh detektor disebut sebagai waktu tambat. Waktu tambat dari suatu komponen yang tidak ditahan oleh fase diam disebut sebagai waktu hampa/void time (t_0). Waktu tambat merupakan fungsi dari laju alir fase gerak dan panjang kolom. Jika fase gerak mengalir lebih lambat atau kolom semakin panjang, waktu hampa dan waktu tambat akan semakin besar, dan sebaliknya bila fase gerak mengalir lebih cepat atau kolom semakin pendek, maka waktu hampa dan waktu tambat akan semakin kecil (Meyer, 2004).

3. Selektifitas

Proses pemisahan antara dua komponen dalam KCKT hanya memungkinkan bila kedua komponen memiliki kecepatan yang berbeda dalam melewati kolom. Kemampuan sistem kromatografi dalam memisahkan/membedakan analit yang berbeda dikenal sebagai selektifitas (α). Selektifitas umumnya tergantung pada sifat analit itu sendiri, interaksinya dengan permukaan fase diam serta jenis fase gerak yang digunakan. Nilai selektifitas yang didapatkan dalam sistem KCKT harus lebih besar dari 1. Selektifitas disebut juga sebagai faktor pemisahan atau tamberan relatif (Meyer, 2004).

4. Daya Pisah (Resolusi)

Daya pemisahan adalah ukuran daya pisah dua kromatogram yang terelusi berdekatan dari dua komponen yang terdapat dalam larutan yang harus terpisahkan sehingga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif secara akurat. Daya pemisahan (R_s) antara dua kromatogram dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$R_s = \frac{2 (tR2 - tR1)}{(w1 + w2)}$$

$tR2$ dan $tR1$ adalah waktu retensi kromatogram pertama dan kedua, sedangkan $w1$ dan $w2$ adalah lebar kromatogram pertama dan kedua yang diukur dengan cara ekstrapolasi sisi puncak yang relatif lurus terhadap garis alas kromatogram. Nilai R_s yang lebih besar dari 1,5 menunjukkan pemisahan yang baik (Menkes RI, 2014).

5. Efisiensi Kolom

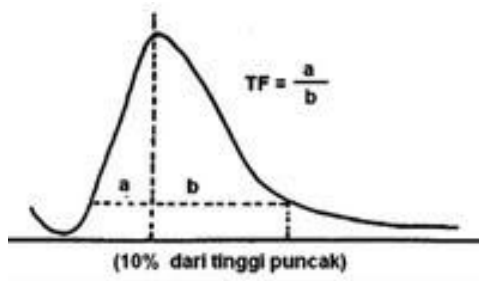
Efisiensi kolom didefinisikan sebagai jumlah lempeng teoritis per meter (N) yang merupakan ukuran ketajaman kromatogram. Untuk fase gerak dan fase diam yang diberikan, N dapat ditentukan untuk memastikan bahwa elusi komponen yang dekat terpisah satu sama lainnya, untuk menetapkan kekuatan pemisahan secara umum dalam suatu sistem, dan untuk memastikan bahwa pembanding internal terpisah dari senyawa obat. Efisiensi kolom adalah bagian dari refleksi ketajaman suatu puncak, sangat penting untuk mendeteksi komponen kecil. Jumlah lempeng teoritis yang lebih besar dari 10000/m dianggap cukup memadai untuk analisis (Menkes RI, 2014). Nilai N dapat dihitung dengan rumus:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

T_R adalah waktu retensi suatu senyawa dan W adalah luas puncak dari dasar, diperoleh dari perhitungan garis lurus disamping puncak ke garis dasar (Menkes RI, 2014).

6. Faktor Asimetris (T_f)

Kromatogram yang memberikan harga $T_f=1$ menunjukkan bahwa kromatogram tersebut bersifat setangkup atau simetris. Harga $T_f>1$ menunjukkan bahwa kromatogram mengalami pengekoran (*tailing*). Semakin besar harga T_f maka kolom yang dipakai semakin kurang .



Gambar II. 2. Puncak kromatografi asimetri

7. Faktor Kapasitas (k')

Faktor kapasitas menyatakan kemampuan senyawa tertentu berinteraksi dengan sistem kromatografi dan menentukan retensi dari senyawa terlarut. Faktor ini merupakan perbandingan waktu atau jumlah senyawa dalam fase diam dan dalam fase gerak. Faktor kapasitas (k') dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$k' = \frac{(t_R - t_n)}{t_n}$$

t_n adalah waktu retensi senyawa yang tidak diretensi oleh kolom dan t_R adalah waktu retensi senyawa tersebut. Jika k' kurang dari satu, maka elusinya sangat cepat sehingga senyawa sedikit diretensi oleh kolom dan kromatogram senyawa terelusi dekat dengan kromatogram senyawa yang tidak diretensi, menunjukkan pemisahan yang buruk. Jika nilai k' sangat besar (antara 20 – 30), waktu elusinya sangat lama sehingga tidak berguna untuk analisis. Nilai k' yang baik diantara 2 – 10 (Menkes RI, 2014).